



**Departamento de Farmacología y Terapéutica**

**Facultad de Medicina**

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Señales de calcio intracelulares mediadas por  
distintos subtipos de receptores nicotínicos y  
su implicación en los procesos de  
neuroprotección**

**Laura del Barrio Díaz**

**Trabajo presentado para optar al Título de Doctor  
por la Universidad Autónoma de Madrid**

**Directora: Manuela García López**



**Departamento de Farmacología y Terapéutica**

**Facultad de Medicina**

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Dra. MANUELA GARCÍA LÓPEZ, Profesora Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,**

**CERTIFICA, que Doña LAURA DEL BARRIO DÍAZ ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: *“Señales de calcio intracelulares mediadas por distintos subtipos de receptores nicotínicos y su implicación en los procesos de neuroprotección”*, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 8 de marzo de 2010.**

**Dra. Manuela García López**

**Profesora Titular de Farmacología**



## COLABORADORES:

### **Javier Álvarez Martín**

Dpto. Fisiología Celular Y Molecular  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valladolid  
c/ Sanz y Forés s/n  
47003 Valladolid (España)

### **Jesús Ávila de Grado**

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Nicolás Cabrera, 1  
Campus de Cantoblanco  
28049 Madrid (España)

### **Javier Egea Máiquez**

Dpto. de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Arzobispo Morcillo, 4  
28029 Madrid (España)

### **María Dolores Martín de Saavedra**

Dpto. de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Arzobispo Morcillo, 4  
28029 Madrid (España)

### **J. Michael McIntosh**

Dpto. de Psiquiatría  
Facultad de Medicina  
Universidad de Utah  
257 South 1400 East  
84112 Salt Lake City  
Utah (Estados Unidos)

### **Mayte Montero Zoccola**

Dpto. Fisiología Celular y Molecular  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valladolid  
c/ Sanz y Forés s/n  
47003 Valladolid (España)

### **Rafael León Martínez**

Dpto. de Química  
Universidad de Cambridge  
Lensfield Road  
CB2 1EW Cambridge (Inglaterra)

### **Esther Parada**

Dpto. de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Arzobispo Morcillo, 4  
28029 Madrid (España)

### **Alejandro Romero**

Dpto. de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Arzobispo Morcillo, 4  
28029 Madrid (España)

### **Ana Ruiz Nuño**

Dpto. Farmacología Clínica  
Hospital Universitario de la Princesa  
Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Diego de León, 62  
28005 Madrid (España)

### **Susan Wonnacott**

Dpto. de Biología y Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Bath  
4 South  
BA2 7AY Bath (Inglaterra)

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**ACh** - Acetilcolina

**AChE** - Acetilcolinesterasa

**AChR** - Receptor de acetilcolina

**Akt** - Proteína cinasa B

**AO** - Ácido okadaico

**APP** - Proteína precursora del péptido amiloide

**ARN** - Ácido ribonucleico

**ARNm** - ARN mensajero

**ATP** - Adenosina trifosfato

**ATPasa** - Adenosina trifosfato fosfatasa

**BAD** - Proteína apoptótica que interacciona con bcl-2

**BGT** -  $\alpha$ -Bungarotoxina

**Ca<sup>2+</sup>** - Calcio

**CAT** - Colino acetil transferasa

**cAMP** - Adenosina monofosfato cíclico

**cdK** - Ciclina dependiente de cinasa

**CICR** - Liberación de calcio inducida por calcio del inglés "calcium induce calcium release"

**CCDV** - Canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje

**DMEM** - Medio Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**EA** - Enfermedad de Alzheimer

**EDTA** - Ácido etilendiaminotetraacético

**RE** - Retículo endoplasmático

**ERK 1/2** - Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2.

**GSK-3** - Glucógeno sintasa cinasa

**IP3** - Inositol-1,4,5 –trifosfato

**JAK-2** - Janus cinasa

**K<sup>+</sup>** - Potasio

**mAChR** - Receptor muscarínico

**MAPK** – Proteína quinasa activada por mitógeno

**MLA** - Metilicaconitina

**Na<sup>+</sup>** - Sodio

**LDH** - Lactato deshidrogenasa

**nAChR** - Receptor nicotínico de acetilcolina

**PCR** - Reacción en cadena de la polimerasa

**PDK1** - Cinasa dependiente de fosfoinositol

**PI3K** - Fosfoinositol-3-cinasa

**PIP2** - Fosfoinositol-4,5-bifosfato cinasa

**PIP3** - Fosfoinositol-3,4,5-trifosfato cinasa

**PKA** - Proteína cinasa A

**PKC** - Proteína cinasa C

**PVDF** - Polivinilidenofluoruro

**RT-PCR** - Reacción en cadena de la polimerasa por la transcriptasa inversa

**PHF** - Filamentos helicoidales emparejados

**SERCA** - Calcio ATPasa reticular

$\tau$  - Tau

# ÍNDICE

<b>I. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>II.1. RECEPTORES PARA LA ACETILCOLINA .....</b>	<b>6</b>
II.1.1. ESTRUCTURA .....	6
II.1.2. SITIOS DE INTERACCIÓN EN LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS .....	8
II.1.2.a. Agonistas .....	8
II.1.2.b. Antagonistas .....	10
II.1.2.c. Moduladores alostéricos .....	12
II.1.3. DIVERSIDAD Y ESPECIALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS .....	13
<b>II.2. FUNCIONALIDAD DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS .....</b>	<b>14</b>
II.2.1. ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$ POR RECEPTORES NICOTÍNICOS .....	14
II.2.2. DESENSIBILIZACIÓN .....	15
II.2.3. DISTINTAS FUENTES DE $\text{Ca}^{2+}$ CONTRIBUYEN AL AUMENTO DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR MEDIADO POR LA ACTIVACIÓN DE nAChR .....	16
II.2.4. SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS .....	18
<b>II.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....</b>	<b>20</b>
II.3.1.a. Implicación del beta amiloide y la proteína tau.....	20
II.3.1.b. Disfunción colinérgica en la Enfermedad de Alzheimer.....	23
<b>II.4. LOS nAChR COMO DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS NEUROPROTECTORES.....</b>	<b>26</b>
II.4.1. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA.....	26
II.4.1.a. Los precursores de ACh .....	26
II.4.1.b. Los inhibidores de AChE .....	26
II.4.1.c. Los moduladores alostéricos de nAChR .....	27
II.4.1.d. Los agonistas nicotínicos.....	27
II.4.2. MECANISMOS NEUROPROTECTORES MEDIADOS POR nAChR .....	27
II.4.2.a. Disminución de la muerte celular .....	28
II.4.2.b. Aumento del número de nAChR .....	28
II.4.2.c. Disminución de la secreción y agregación de $\text{A}\beta$ .....	29
II.4.3. SUBTIPOS DE nAChR IMPLICADOS EN LA NEUROPROTECCIÓN .....	29

II.4.4. IMPLICACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN EL MECANISMO NEUROPROTECTOR MEDIADO POR nAChR. ....	30
II.4.5. CINASAS ACTIVADAS POR nAChR Y SU IMPLICACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE RUTAS DE SUPERVIVENCIA.....	31
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>IV.1. CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>35</b>
IV.1.1. CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS .....	35
IV.1.1.a. Origen y características .....	35
IV.1.1.b. Preparación del cultivo primario de células cromafines bovinas .....	37
IV.1.2. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y .....	38
IV.1.2.a. Origen y características .....	38
IV.1.2.b. Cultivo y mantenimiento de la línea celular .....	39
<b>IV.2. DETERMINACIÓN DE SEÑALES DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> INTRACELULARES .....</b>	<b>39</b>
IV.2.1. MEDIDA DE SEÑALES DE $[\text{Ca}^{2+}]_c$ MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES EN POBLACIONES CELULARES. ....	39
IV.2.2. MEDIDA DE SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ CITOSÓLICO Y MITOCONDRIAL MEDIANTE EL EMPLEO DE AEQUORINAS. ....	40
<b>IV.3. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....</b>	<b>41</b>
<b>IV.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR.....</b>	<b>42</b>
IV.4.1. ESTÍMULO CITOTÓXICO: ÁCIDO OKADAICO.....	42
IV.4.2. PROTOCOLOS DE APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS .....	43
IV.4.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LÁCTICO DESHIDROGENASA COMO PARÁMETRO DE MUERTE CELULAR. ....	44
<b>IV.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE WESTERN BLOT .....</b>	<b>45</b>
<b>IV.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>V.1. CARACTERIZACIÓN DE SEÑALES DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> INTRACELULARES Y SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS MEDIADAS POR nAChR <math>\alpha 7</math> Y <math>\text{no-}\alpha 7</math> EN LA CÉLULA CROMAFÍN BOVINA.....</b>	<b>48</b>
V.1.1. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES INDUCIDAS POR NICOTINA Y 5IA85380: LA RESPUESTA $\text{NO-}\alpha 7$ .....	48
V.1.2. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES MEDIADAS POR LOS AGONISTAS $\alpha 7$ SELECTIVOS, PNU282987 Y COLINA.....	50

V.1.3. EL MODULADOR ALOSTÉRICO SELECTIVO $\alpha 7$ POTENCIA LAS SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES MEDIADAS POR BAJAS CONCENTRACIONES DE PNU282987 Y COLINA: LA RESPUESTA $\alpha 7$ .....	51
V.1.4. CONCENTRACIONES BAJAS DE NICOTINA EN PRESENCIA DEL MODULADOR ALOSTÉRICO $\alpha 7$ PNU120596 PRODUCEN SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ SENSIBLES A BGT. ....	54
V.1.5. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS BGT, MLA Y MECAMILAMINA SOBRE LAS SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ MEDIADAS POR nAChR $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ .....	55
V.1.6. DESENSIBILIZACIÓN DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ MEDIADA POR nAChR $\alpha 7$ .....	57
V.1.7. CONTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE CCDV A LOS INCREMENTOS DE $\text{Ca}^{2+}$ CITOSÓLICO MEDIADOS POR nAChR $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ .....	62
V.1.8. CONTRIBUCIÓN DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO AL INCREMENTO DE LA $[\text{Ca}^{2+}]_c$ INDUCIDA TRAS LA ESTIMULACIÓN DE LOS nAChR $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ .....	63
V.1.9. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LOS TRANSITORIOS DE $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .....	64
V.1.10. LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN DE LOS nAChR DEL SUBTIPO $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ .....	66
<b>V.2. MECANISMOS NEUROPROTECTORES MEDIADOS TRAS LA ACTIVACIÓN DE nAChR <math>\alpha 7</math> Y NO-<math>\alpha 7</math> EN UN MODELO DE HIPERFOSFORILACIÓN DE <math>\tau</math> .....</b>	<b>68</b>
V.2.1. EFECTO NEUROPROTECTOR DE DIVERSOS AGONISTAS NICOTÍNICOS Y EL MODULADOR ALOSTÉRICO $\alpha 7$ PNU120596 FRENTE A LA LESIÓN INDUCIDA POR ÁCIDO OKADAICO. ....	68
V.2.2. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES INDUCIDAS POR PNU282987 Y 5IA85380. ....	70
V.2.3. EL PNU120596 REVIERTE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR EL PNU282987 .....	72
V.2.4. DEPENDENCIA DEL $\text{Ca}^{2+}$ EXTRACELULAR EN LOS PROCESOS DE NEUROPROTECCIÓN MEDIADOS POR ESTIMULACIÓN DE nAChR DEL SUBTIPO $\alpha 7$ Y $\beta 2^*$ .....	73
V.2.5. LA CINASA JAK-2 ESTÁ IMPLICADA EN LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LOS nAChR $\alpha 7$ PERO NO EN LA MEDIADA POR nAChR $\beta 2^*$ .....	76
V.2.6. LA VÍA PI3K/Akt ESTÁ IMPLICADA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DEL PNU282987 Y DEL 5IA85380 .....	78
V.2.7. ERK 1/2 ESTÁ IMPLICADA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE 5IA85380 PERO NO EN EL DE PNU282987. ....	80
V.2.8. IMPLICACIÓN DE GSK-3 $\beta$ EN LA NEUROPROTECCIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE nAChR $\alpha 7$ Y $\beta 2^*$ .....	82
V.2.9. ACCIÓN DE PNU282987 Y 5IA85380 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA $\tau$ .....	87
<b>VI. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>88</b>



<b>VI.1. SEÑALES DE <math>\text{Ca}^{2+}</math> Y LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS MEDIADAS POR RECEPTORES <math>\alpha 7</math> Y NO-<math>\alpha 7</math> EN LA CÉLULA CROMAFÍN BOVINA.....</b>	<b>88</b>
<b>VI.2. NEUROPROTECCIÓN MEDIADA POR nAChR <math>\alpha 7</math> y <math>\beta 2^*</math> EN CÉLULAS SH-SY5Y LESIONADAS CON ÁCIDO OKADAICO .....</b>	<b>97</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>109</b>

## I. JUSTIFICACIÓN

Esta tesis doctoral se enmarca en una de las líneas principales del Instituto Teófilo Hernando para la I + D del Medicamento (ITH), a saber, el estudio y la búsqueda de fármacos neuroprotectores contra enfermedades como la Enfermedad de Alzheimer (EA).

En los últimos tiempos la esperanza de vida de la población ha aumentado considerablemente y con ello se está produciendo un incremento significativo en la incidencia de ciertas patologías características de la población anciana. Un claro ejemplo de este tipo de patologías es la EA. En el año 2005, se estimó que había 24 millones de personas con esta demencia en el mundo y que estas cifras casi se multiplicarían por dos cada 20 años, siendo aproximadamente 40 millones de personas en el año 2020 y 81 millones en el 2040 (Ferri *et al.*, 2005). Además, el coste medio por enfermo es altísimo por los múltiples cuidados que requieren. Todas estas circunstancias hacen que encontrar nuevas estrategias para el tratamiento de estos enfermos sea muy urgente.

Aunque otros mecanismos puedan estar relacionados en el desarrollo de la EA, hay suficientes evidencias que permiten pensar que la disfunción de la transmisión colinérgica desempeña un papel clave en la enfermedad. Por ello, se han realizado múltiples aproximaciones terapéuticas para contribuir a la mejora de esta disfunción mediante la búsqueda de precursores de la síntesis de acetilcolina (ACh), inhibidores de la acetilcolinesterasa, moduladores alóstericos positivos o agonistas de receptores nicotínicos. Sin embargo, el mecanismo molecular y fisiológico a través del cual la activación del receptor permite un efecto neuroprotector aún hoy está por determinar.

En concreto, la investigación que se presenta en esta tesis doctoral, se centra en la caracterización funcional de los distintos subtipos de receptores nicotínicos así como en el estudio de los mecanismos neuroprotectores mediados por la activación de los mismos.

## **II. INTRODUCCIÓN**

### **II.1. RECEPTORES PARA LA ACETILCOLINA**

#### **II.1.1. ESTRUCTURA**

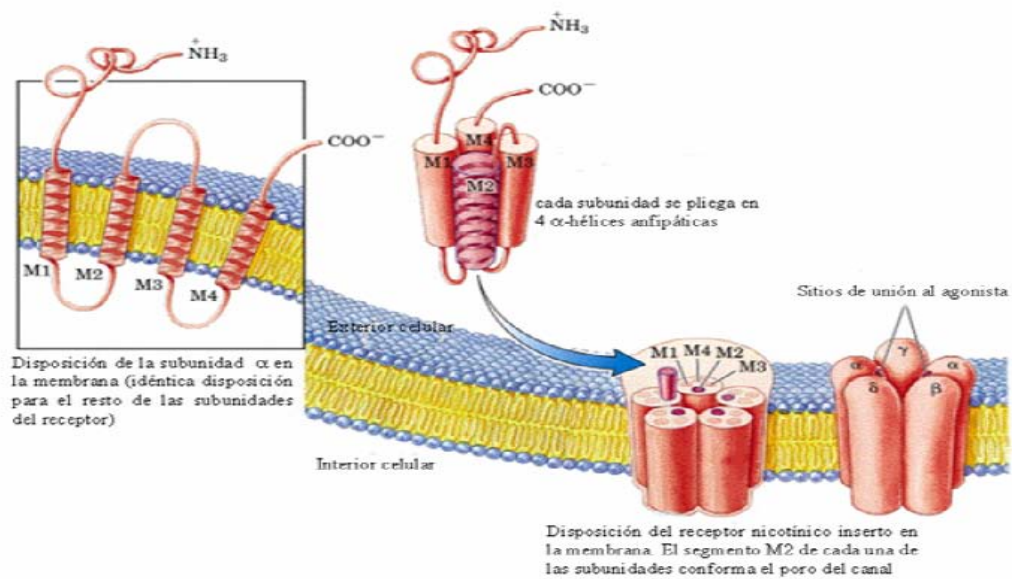
Los receptores nicotínicos de acetilcolina (AChR) son receptores regulados por ligando y se clasifican en dos subtipos: receptores muscarínicos metabotrópicos y receptores nicotínicos ionotrópicos. Ambos subtipos comparten la propiedad de activarse por el neurotransmisor endógeno ACh y se expresan tanto en células neuronales como no neuronales (Albuquerque *et al.*, 2009).

Los receptores muscarínicos (mAChR) son proteínas transmembrana acopladas a proteínas G que se activan lentamente (milisegundos a segundos) y que, dependiendo de los subtipos (M1-M5) activados, producen alteraciones en la homeostasis celular de la fosfolipasa C, inositol trifosfato, cAMP y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular.

El otro gran subtipo, anteriormente mencionado, el receptor nicotínico ionotrópico, (nAChR) es un canal catiónico cuya actividad se induce, por unión de ligando, en el rango de micro a submicrosegundos. Existen distintos subtipos de receptores nicotínicos dependiendo de las subunidades que lo conforman. Estos, se expresan de forma diferencial en diversos tipos celulares desde el músculo hasta otros tipos no neuronales como la piel, el páncreas y el pulmón así como en neuronas del sistema nervioso central y periférico. La heterogeneidad anatómica y la existencia de distintos subtipos de receptores, implica una especialización funcional de los mismos que aún hoy no está del todo establecida.

Los nAChR son estructuras proteicas de aproximadamente 270-290 KDa localizadas en la membrana plasmática. Se componen de cinco subunidades que forman un canal permeable a iones. A grandes rasgos, se sabe que cada subunidad consta de 4

segmentos transmembrana (M1, M2, M3 y M4) (Corbin *et al.*, 1998), dos bucles intracelulares, un extremo amino y carboxi - terminal extracelulares (Fig. 1).



**Figura 1. Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina.**

En el sistema nervioso, se han identificado 9 subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) y 3 subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), codificadas por genes distintos. La subunidad  $\alpha 8$  no se ha detectado en tejidos de ave, no así, en mamífero. Estas subunidades son capaces de unirse entre sí con diferentes estequiometrías dando lugar a receptores funcionales homoméricos (formados sólo por subunidades  $\alpha$ ) o heteroméricos (formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ).

Las subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son capaces de formar receptores funcionales homoméricos. La subunidad  $\alpha 10$  también puede formar heterómeros con la subunidad  $\alpha 9$ .

Las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , sin embargo, necesitan de las subunidades  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  o  $\beta 4$  para formar receptores funcionales (receptores heteroméricos, p.ej.:  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ) con una estequiometría  $\alpha(2)\beta(3)$  (Cooper *et al.*, 1991).

Las propiedades farmacológicas de un determinado subtipo de nAChR dependen de la estructura, del sitio de unión del agonista, así como de las interacciones de los

aminoácidos que modifican la conformación de un receptor. Por tanto, la distinta composición de las subunidades del receptor determina sus características funcionales en cuanto a la interacción con agonistas, antagonistas y moduladores.

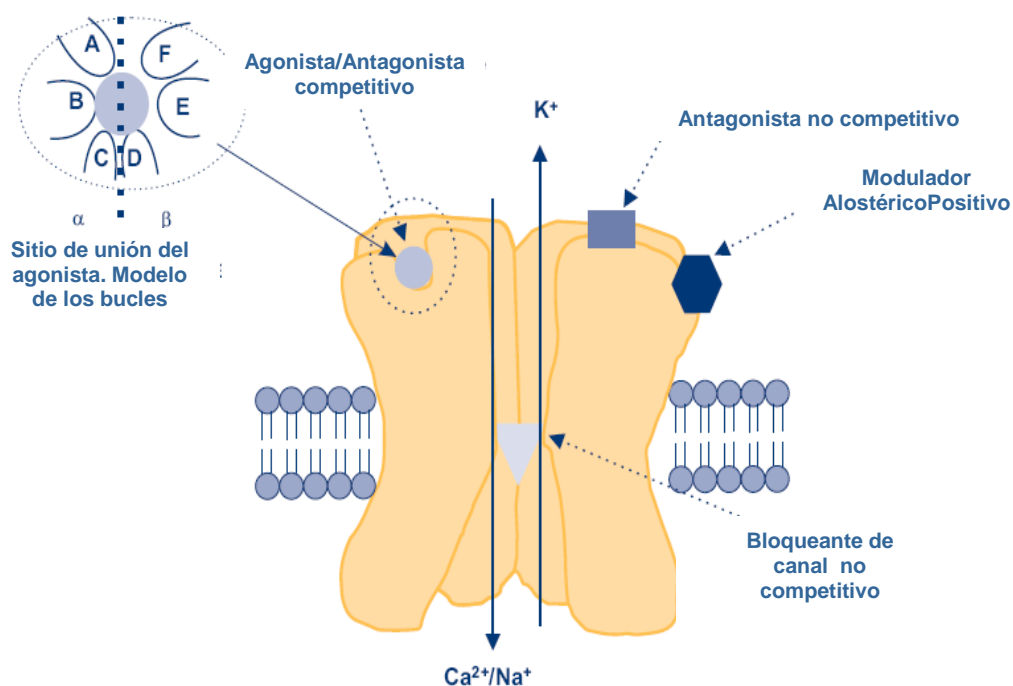
## **II.1.2. SITIOS DE INTERACCIÓN EN LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS**

### **II.1.2.a. Agonistas**

El agonista interacciona con determinados aminoácidos presentes en un bolsillo hidrofóbico formado por dos subunidades adyacentes. El agonista se une a una subunidad situada por “delante”, que es el principal sitio de unión y, por “detrás” a la subunidad adyacente en el sitio complementario de unión. La unión del receptor a ambos sitios es necesaria para que se abra el canal.

El principal sitio de unión se encuentra en el extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  o  $\alpha 9$ ). En este extremo se encuentran dos residuos de cisteína característicos de la subunidad  $\alpha$  y cuatro aminoácidos (Tyr 93, Trp149, Tyr 190 y Tyr 198) que son esenciales para la unión del agonista al receptor. Éstos aminoácidos aromáticos son capaces de interaccionar con el ligando, ya que se encuentran expuestos hacia la luz del bolsillo en los llamados bucles A, B y C (Fig. 2). Las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha 10$  no pueden desempeñar el papel típico de una subunidad  $\alpha$  ya que no presentan aminoácidos críticos en la interacción del agonista al principal sitio de unión al receptor.

Las subunidades  $\beta$  carecen de las cisteínas del extremo amino terminal, sin embargo, pueden aportar los aminoácidos que conforman el sitio complementario de unión al ligando. En el sitio complementario, los aminoácidos que más contribuyen a la unión son Leu 112, Met 114 y Trp 53, incluidos en los bucles D, E y F (Fig 2) de las subunidades  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$ . La subunidad  $\beta 3$  carece del extremo del bucle D lo que impide que ésta participe en el sitio de unión del agonista. La similitud en las secuencias de las subunidades  $\alpha 5$  y  $\beta 3$  concuerda con el hecho de que ninguna de ellas participe en los sitios de unión del agonista al receptor.



**Figura 2. Estructura y lugares de unión de los agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos en el receptor nicotínico.**

Las subunidades  $\alpha$  de los receptores homoméricos son capaces de aportar los dos sitios de unión al agonista formando receptores con cinco sitios de unión al receptor. Está descrito que el receptor  $\alpha 7$  necesita más de dos sitios de unión ocupados por el agonista para que el canal se abra. Sin embargo, los receptores heteroméricos, cuentan con dos sitios de unión al receptor (Gotti *et al.*, 2007) y el canal es funcional con tan sólo la unión de una molécula de agonista (Stauderman *et al.*, 1998).

El subtipo  $\alpha 7$  además, presenta una baja afinidad por el ligando (Albuquerque *et al.*, 2009), en comparación con los de alta afinidad por el agonista como son los heteroméricos  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 4$  (Ver la tabla I).

En general, la identidad de los aminoácidos presentes en el principal sitio de unión determina la afinidad por el ligando mientras que los aminoácidos del sitio complementario determinan la selectividad.

**Tabla I: Características farmacológicas y cinéticas de los ligandos agonistas de los nAChR.**

Agonistas	Comentario	Afinidad $K_i$ (nM)			Potencia $EC_{50}$ ( $\mu$ M)		
		$\alpha 4\beta 2^*$	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 4$	$\alpha 4\beta 2^*$	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 4$
<b>Acetilcolina</b>	Agonista nicotínico y muscarínico endógeno. Susceptible a hidrólisis	6.8-57	4000-10830	560-881	0.48-3	79-316	53-210
<b>(-)(-) Citisina</b>	Mayor afinidad por receptores $\beta 4^*$ que $\beta 2^*$	0.012-1.5	260-15000	54-220	0.019-2.6	5.6-7.1	14-72
<b>Colina</b>	Producto de la hidrólisis de la acetilcolina.	112000	2380000	n. d.	n. d.	1600	n. d.
<b>(±)-Epibatidina</b>	Agonista nicotínico muy potente	0.01-0.05	20.6-233	0.38	n. d.	1.3-3.5	n. d.
<b>5-Iodo-A-85380</b>	Agonista selectivo $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 6\beta 2$	0.01-0.2	250-6145	50-280	0.013	---	5
<b>(-)-Nicotina</b>	Activa todos los subtipos excepto $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$	0.6-10	400-15000	290-476	0.35-5	49-113	8.1-110
<b>PNU 282987</b>	Agonista selectivo $\alpha 7$	n. d.	26	$IC_{50} \geq 60\mu$ M	---	0.128	---

*n.d.*= no determinado.

Datos tomados de “Nicotinic ACh Receptors” (TOCRIS Bioscience Scientific Review) por Susan Wonnacott y Jacques Barik ([www.tocris.com](http://www.tocris.com)).

Por tanto, la diversidad de las subunidades que conforman un receptor determinan sus características farmacológicas y, consecuentemente, su función y distribución anatómica.

### **II.1.2.b. Antagonistas**

Los antagonistas competitivos, interaccionan cerca o en el sitio de unión del agonista, estabilizando al receptor en una conformación cerrada y previniendo la unión

del agonista. La inhibición con antagonistas reversibles, puede ser contrarrestada a altas concentraciones de agonista, por eso, la concentración adecuada para la utilización de un antagonista debe ser valorada según la concentración de agonista utilizada. Los antagonistas no competitivos no compiten por el sitio de unión del agonista e interaccionan con sitios distintos, incluso en el lumen del canal del nAChR.

Desafortunadamente, hay un número limitado de antagonistas selectivos para cada subtipo. A continuación se mencionan algunos de ellos.

**Tabla II: Características farmacológicas de los antagonistas nAChR.**

<b><u>Antagonista</u></b>	<b><u>Modo de acción</u></b>	<b><u>Especificidad</u></b>	<b><u>Concentración efectiva in vitro</u></b>
<b><math>\alpha</math>-Conotoxina A<math>\alpha</math>1B</b>	Competitivo?	$\alpha$ 3 $\beta$ 4*	1-10 $\mu$ M
<b><math>\alpha</math>-Conotoxina MII</b>	Competitivo?	$\alpha$ 3/ $\alpha$ 6 $\beta$ 2*	10-120nM
<b><math>\alpha</math>-Bungarotoxina (BGT)</b>	Competitivo irreversible	$\alpha$ 7 y $\alpha$ 9/ $\alpha$ 9 $\alpha$ 10	10-100nM
<b>Dihidro-<math>\beta</math>-eritroidina (DH<math>\beta</math>E)</b>	Competitivo	$\beta$ 2> $\beta$ 4	1-10 $\mu$ M
<b>Metilicacconitina (MLA)</b>	Competitivo reversible	$\alpha$ 7, $\alpha$ 9/ $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 y $\alpha$ 6 $\beta$ 2*	10-100nM
<b>Mecamilamina</b>	No competitivo	$\alpha$ $\beta$ > $\alpha$ 7	1-10 $\mu$ M

*Datos tomados de "Nicotinic ACh Receptors" (TOCRIS Bioscience Scientific Review) por Susan Wonnacott y Jacques Barik ([www.tocris.com](http://www.tocris.com)).*



### II.1.2.c. Moduladores alostéricos

Existen ciertos ligandos que se unen a sitios distintos del sitio de unión del agonista, modulando las transiciones conformacionales del receptor y su función. Los moduladores que potencian la función del receptor se llaman positivos y los que inhiben la función, negativos.

El nAChR  $\alpha 7$  es un subtipo modelo para el estudio de la modulación positiva debido a su baja afinidad por acetilcolina y rápida desensibilización. Existen múltiples moduladores alostéricos con distintos mecanismos de acción. A continuación se describen algunos de ellos.

**Tabla III: Características farmacológicas de los moduladores alostéricos positivos**

POSITIVOS	EC <sub>50</sub> (in vitro)
<b>Galantamina:</b> Agonista y modulador alostérico de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ .	n.d.
<b>Ivermectina:</b> Mas potente frente a receptores GABA <sub>A</sub> y glicina	n.d.
<b>5-hidroxiindol:</b> Metabolito del 5-HT. Aumenta la potencia y eficacia sin modificar la desensibilización y afinidad por el agonista.	2.5 mM
<b>PNU 120596:</b> Aumenta la potencia, eficacia, afinidad por el agonista y mantiene abierto el estado desensibilizado. No tiene efecto sobre $\alpha 4\beta 2$ , $\alpha 3\beta 4$ ni $\alpha 9\alpha 10$ . Solubilidad limitada.	200 nM

*Datos tomados de "Nicotinic ACh Receptors" (TOCRIS Bioscience Scientific Review) por Susan Wonnacott y Jacques Barik ([www.tocris.com](http://www.tocris.com)).*

Otro tipo de modulación alostérica es la que se da por fosforilación entre los dominios intracelulares transmembrana M3 y M4 del receptor. Ésta fosforilación es llevada a cabo por unas proteínas pertenecientes a la familia de las SFKs, las Src-cinasas. Se ha descrito que estas cinasas se encuentran acopladas físicamente a los receptores del subtipo  $\alpha 7$  (neuronas rata) y  $\alpha 3\beta 4^*$  (cromafines bovinas). Sin embargo, las consecuencias funcionales de su fosforilación son opuestas según el subtipo de receptor sobre el que actúen. La defosforilación del receptor  $\alpha 7$  por genisteína

(inhibidor de las SFK) produce un aumento de la actividad de éste, sin embargo, cuando se defosforila el subtipo  $\alpha 3\beta 4^*$ , la actividad del receptor disminuye.

Esta modulación diferencial así como las propiedades farmacológicas características de cada subtipo de receptor, indica una probable especialización funcional de los mismos.

### II.1.3. DIVERSIDAD Y ESPECIALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS

Existe una distribución anatómica diferencial de los distintos subtipos de receptores nicotínicos. La pregunta es si esta diversidad supone una función redundante o un diseño funcional específico de los distintos subtipos.

Mediante múltiples técnicas como la hibridación *in situ*, unión de radioligandos, PCR, inmunoprecipitación, etc se han ido caracterizando los distintos subtipos presentes en el sistema nervioso.

-En el sistema nervioso autónomo: ganglios simpáticos, innervación parasimpática, ganglios sensoriales, células cromafines, neuroblastoma humano (SHSY-5Y) y células PC12. En estas células se expresan generalmente las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$ , formando receptores  $\alpha 3\beta 4^*$ ,  $\alpha 3\beta 2^*$  y  $\alpha 7^*$ , donde \* indica la posible inclusión de otras subunidades.

-En el sistema nervioso central: existe una distribución heterogénea de subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 7$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ . Las subunidades más ampliamente expresadas son  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  y  $\alpha 7$ , formando receptores  $\alpha 4\beta 2^*$  y  $\alpha 7^*$ . El subtipo  $\alpha 7$  es predominante en hipocampo y está asociado a procesos de atención y memoria. Como consecuencia, este subtipo constituye una diana terapéutica para tratar enfermedades con alteraciones cognitivas como la Enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia (Haydar & Dunlop). El subtipo  $\alpha 4\beta 2$ , muy abundante en el tálamo, se ha implicado en procesos de dependencia a la nicotina (Picciotto *et al.*, 1998; Marubio *et al.*, 2003) y otras drogas (Crunelle *et al.*).

-Células no neuronales: astrocitos, macrófagos (Gerzanich *et al.*, 1998), queratinocitos de la piel (Grando, 1997), células de endotelio vascular (Conti-Fine *et al.*, 2000), musculares, linfocitos (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995; Skok *et al.*, 2003; Skok *et al.*, 2005) y en células pulmonares. En estos sistemas se han detectado mRNAs para la mayoría de las subunidades del nAChR. El papel fisiológico de estos receptores, en estas células, está aún por determinar, aunque el receptor  $\alpha 7$  en macrófagos está cobrando gran interés por su implicación en procesos inflamatorios (Gerzanich *et al.*, 1998).

## **II.2. FUNCIONALIDAD DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS**

### **II.2.1. ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$ POR RECEPTORES NICOTÍNICOS**

Los receptores nAChR se componen de 5 subunidades dispuestas formando un poro que permite el paso de pequeños iones monovalentes y divalentes a su través. En el estado cerrado o inactivo, el canal iónico (3Å de diámetro) está ocluido por un cinturón hidrofóbico que constituye una barrera impermeable a iones.

Mediante la unión de un ligando, experimentan un cambio conformacional en el que se exponen residuos hidrofílicos al haz del poro y apertura del canal (8Å de diámetro) lo que permite el paso del estado cerrado a un estado abierto o activo. A través del poro se produce el flujo de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hacia el interior celular. Se ha descrito que el receptor  $\alpha 7$  presenta el mayor ratio de permeabilidad  $\text{Ca}^{2+}:\text{Na}^+$  (Bertrand *et al.*, 1993; Fucile *et al.*, 2003). Los receptores heteroméricos tienen un ratio de permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  del 2-5% (Fucile, 2004). Sin embargo, la incorporación de subunidades  $\alpha 5$  a nAChR  $\alpha 3^*$  humanos incrementa significativamente su permeabilidad (Gerzanich *et al.*, 1998).

### II.2.2. DESENSIBILIZACIÓN

Si la exposición al agonista es continuada, el receptor pasa a un estado inactivo llamado desensibilizado (Giniatullin *et al.*, 2005). Se sabe que en este estado, los receptores presentan una mayor afinidad por ligando, lo que ha llevado a pensar que es el propio agonista retenido, el causante del bloqueo del canal en el estado desensibilizado (Maconochie & Knight, 1992). Los residuos hidrofílicos que se disponen en el haz del poro durante el estado activo del subtipo  $\alpha 7$ , son ácidos glutámicos a diferencia de los residuos polares pero sin carga aportados por las subunidades  $\alpha 3$ . Además de los compuestos que interaccionan con residuos en la boca y en el lumen del poro, se predice que cualquier molécula pequeña cargada positivamente puede bloquear el canal, y muchos agonistas, incluida la propia ACh hace esto a altas concentraciones (Ogden & Colquhoun, 1985). Puede que estas cargas negativas en el haz del poro del nAChR  $\alpha 7$  sean responsables de su rápida desensibilización (Olale *et al.*, 1997) por impedimento estérico de las moléculas cargadas positivamente que se unen a él en el estado abierto.

La desensibilización del receptor es un proceso complejo que tarda de segundos a minutos (dependiendo del subtipo) y que incluye múltiples estados de los cuales se sabe poco acerca de las diferencias estructurales entre estos estados (Giniatullin *et al.*, 2005). El estudio de este proceso se realiza generalmente mediante el cálculo del porcentaje de caída de corriente durante la exposición continua al agonista o la disminución de corriente en una segunda aplicación de agonista en experimentos de pulsos repetidos.

La desensibilización aumenta en forma concentración dependiente (Fatt, 1950; Katz & Thesleff, 1957) y con el tiempo de exposición al agonista. Aunque la recuperación del estado desensibilizado puede ser total después de pulsos cortos de agonista, si la aplicación del agonista es prolongada, se puede dar una pérdida de la función llegando a ser casi irreversible (Boyd, 1987).

Los distintos subtipos de nAChR presentan distintos tiempos de desensibilización dependiendo de las subunidades que lo conforman. Se sabe que el estado de

desensibilización depende de la estructura de los segmentos transmembrana así como de los dominios citoplasmáticos (Albuquerque *et al.*, 2009).

Así, se sabe que el receptor  $\alpha 7$  se desensibiliza durante períodos más largos que los otros subtipos de nAChR y, que la presencia de la subunidad  $\alpha 5$  produce un relantecimiento del proceso de desensibilización.

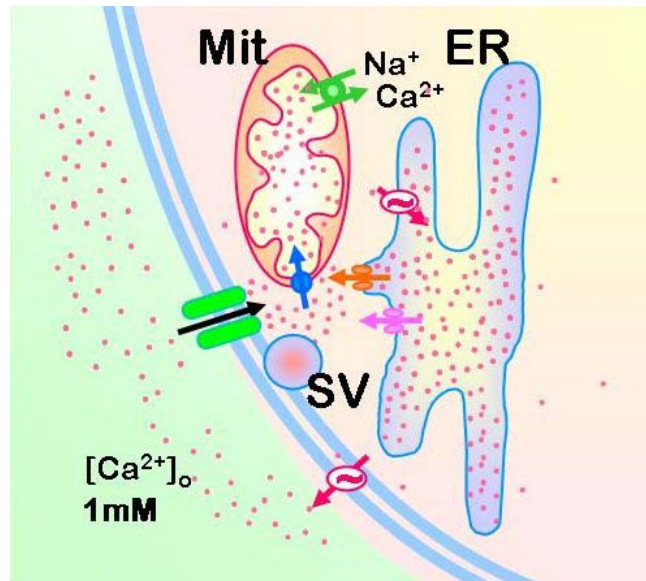
### **II.2.3. DISTINTAS FUENTES DE $\text{Ca}^{2+}$ CONTRIBUYEN AL AUMENTO DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR MEDIADO POR LA ACTIVACIÓN DE nAChR**

Como se ha mencionado en el apartado anterior, en células excitables, al estimular el nAChR se produce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  al interior celular. La entrada de  $\text{Na}^+$  a través del nAChR activa los canales de  $\text{Na}^+$  presentes en la membrana plasmática lo que produce una entrada de iones  $\text{Na}^+$  al espacio intracelular. Todo este flujo de cationes al interior celular, provoca una despolarización de la membrana plasmática lo que ocasiona la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En células cromafines bovinas existen distintos subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje que varían en porcentaje según las especies (Garcia *et al.*, 2006) y se desensibilizan por  $\text{Ca}^{2+}$  (Hernandez-Guijo *et al.*, 2001) y por voltaje (Artalejo *et al.*, 1987).

En situación de reposo el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se mantiene muy bajo ( $0,1 \mu\text{M}$ ), gracias a que existen bombas de “achique” que lo expulsan al exterior celular ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa e intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  del plasmalema) o hacia el retículo endoplasmático ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa o SERCA). Al activarse la célula, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se eleva bruscamente hasta 100 o más veces por encima de su concentración basal. Este aumento se hace a expensas de dos fuentes, extra e intracelular. En células excitables, una pequeña cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra del medio extracelular o la aplicación de cafeína puede activar un canal del retículo endoplasmático, lo que permite la salida hacia el citosol de  $\text{Ca}^{2+}$

almacenado (800-900  $\mu\text{M}$  de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Alonso *et al.*, 1999). Como el  $\text{Ca}^{2+}$ , la cafeína también abre este canal, y la rianodina lo bloquea; por ello este canal de calcio intracelular recibió el nombre de canal de rianodina. A este proceso de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo por entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol se le denomina CICR (del inglés “Calcium Induced Calcium Released”).



**Figura 3. Estructuras celulares que participan en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular. Mitocondria (Mit), retículo endoplásmico (ER) vesículas secretoras (SV) ([www.ibgm.med.uva](http://www.ibgm.med.uva)).**

La mitocondria, es el orgánulo en el que se fabrica la moneda energética universal, el ATP. La formación de ATP se incrementa durante la activación celular y el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en este proceso. La elevación de calcio en la luz mitocondrial ocasiona la activación de deshidrogenadas y la formación de ATP. En otras palabras, el  $\text{Ca}^{2+}$  acopla la producción de ATP al incremento de la demanda de energía que se produce durante la activación celular.

El  $\text{Ca}^{2+}$  entra al interior mitocondrial por el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  y sale por un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . El uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  se pone en marcha cuando se eleva la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , para bombear el catión al interior mitocondrial. Utilizando sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidas al interior mitocondrial se ha visto que tras la

despolarización de células cromafines con acetilcolina,  $K^+$  o cafeína, el  $Ca^{2+}$  mitocondrial aumenta a concentraciones que pueden llegar al rango milimolar (Montero *et al.*, 2000). Este  $Ca^{2+}$  se libera de nuevo al citosol en pocos segundos. Todo ello sugiere que los CCDV, el retículo endoplasmático y la mitocondria parecen estar muy próximos entre sí, formando una unidad funcional que controlaría la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular (Ver figura 3).

#### II.2.4. SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS

La liberación de neurotransmisores y catecolaminas se lleva a cabo por el proceso denominado exocitosis. Es un proceso muy organizado y regulado en el que participan varias proteínas y estructuras del citoesqueleto para transportar las vesículas desde los depósitos de reserva hasta su lugar de atraque en aquellos sitios activos del plasmalema en donde, cuando llegue un potencial de acción, se dé el proceso de fusión y la secreción al medio extracelular del contenido intravesicular. Para la formación del complejo proteico que permite la secreción, también es necesaria la hidrólisis de ATP.

Desde que se conociera la importancia del  $Ca^{2+}$  en los procesos de acoplamiento estímulo-secreción (Douglas & Rubin, 1961) se ha buscado el receptor intracelular para dicho catión. Parece ser que la sinaptotagmina, una proteína ubicada en la membrana de la vesícula podría ser la que, al unirse al  $Ca^{2+}$ , cambiaría de conformación dando lugar al proceso de exocitosis.

Se sabe que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los distintos subtipos de CCDV pueden regular la secreción de catecolaminas (Lopez *et al.*, 1994) y que los P/Q se localizan más cerca de los sitios de secreción que los de tipo L (Lara *et al.*, 1998).

El papel de la mitocondria en la secreción de catecolaminas es fundamental desde que se ha demostrado que la interrupción de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria utilizando el protonóforo CCCP, potencia exageradamente las respuestas secretoras de catecolaminas, en células estimuladas con acetilcolina,  $K^+$  o cafeína (Montero *et al.*,

2000). Se piensa que la secreción rápida de vesículas ya atracadas o muy cercanas al plasmalema (vesículas de liberación rápida) depende sobre todo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel del subplasmalema (CCDV y el propio receptor). Sin embargo, la mitocondria desempeña un papel importantísimo en la secreción a tiempos más largos y cuando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico son elevadas (Montero *et al.*, 2001). La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  hacia zonas del citosol alejadas del plasmalema facilita el transporte de vesículas desde un depósito de vesículas de reserva hasta el depósito subplasmalemal. De ésta manera, la exocitosis se puede mantener durante períodos más prolongados. Ello sugiere que la mitocondria controla la disponibilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  en la maquinaria secretora y, por tanto, regula la exocitosis (Montero *et al.*, 2000).

En células cromafines bovinas, la mayoría de los estudios demuestran que el receptor implicado en la secreción de catecolaminas es insensible a BGT. El receptor que hasta ahora se supone desempeña esta función es el  $\alpha 3\beta 4^*$ . Sin embargo, la presencia de receptores  $\alpha 7$  es bien descrita (Wilson & Kirshner, 1977) y su expresión es aproximadamente igual a la conocida en hipocampo de rata (El-Hajj *et al.*, 2007), donde el subtipo  $\alpha 7$  está ampliamente distribuido. En 1998, López y col. (Lopez *et al.*, 1998) consiguieron ver una implicación parcial de de éste subtipo de receptor en procesos de secreción de catecolaminas mediante la utilización de pulsos cortos de ACh y distintos antagonistas selectivos  $\alpha 7$ .



### **II.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que a nivel celular se acompaña de una muerte neuronal (Cummings, 2004) que afecta sobre todo a las neuronas colinérgicas en los núcleos basales de Meynert (Whitehouse *et al.*, 1982).

#### **II.3.1.a. Implicación del beta amiloide y la proteína tau**

La fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA) es compleja y todavía no del todo esclarecida. A nivel histológico, se caracteriza por la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares ricos en proteína tau hiperfosforilada (Lee & Trojanowski, 1992) y placas seniles que son depósitos extracelulares de péptidos amiloides (Price *et al.*, 1991). De ahí que se haya implicado un mal procesamiento de estas dos proteínas en la fisiopatología de esta enfermedad.

Los péptidos de beta amiloide se generan por la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP). La APP se corta primero por dos complejos proteicos mediante  $\alpha$  o  $\beta$  secretasa y, después, por  $\gamma$  secretasa. El corte de APP por  $\alpha$  y  $\gamma$  secretasa previene la formación de péptidos amiloides y el corte por  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa aumenta el APP soluble y el péptido amiloide. Los principales péptidos que componen las placas seniles son los péptidos  $A\beta_{1-42}$  y  $A\beta_{1-40}$ . Un aumento en la razón del péptido 1-42 entre el 1-40 se ha relacionado con la EA (Kumar-Singh *et al.*, 2006). La implicación del beta amiloide en la EA se sustenta en gran medida en base a que en los casos familiares de EA existen mutaciones de APP o de las enzimas presenilinas encargadas de su degradación; ambas alteraciones conllevan un aumento de beta amiloide. Sin embargo, estos casos familiares tan solo suponen un 1-2% de todos los casos de EA. Además, la presencia de placas seniles aumenta fisiológicamente con la edad del paciente y, sin embargo, el grado de demencia se ha correlacionado fundamentalmente con la muerte de neuronas en localizaciones específicas con un mayor número de ovillos neurofibrilares.

Sin embargo, cada día hay más evidencias que ponen de manifiesto una interrelación entre el péptido A $\beta$  y la proteína  $\tau$ . Así hay estudios que muestran que la toxicidad del péptido A $\beta$  depende de la expresión de  $\tau$  (Rapoport, 2002) y en ratones transgénicos se ha visto que la expresión de  $\tau$  puede afectar la toxicidad inducida por el A $\beta$  (Roberson *et al.*, 2007). La idea de que la hiperfosforilación de  $\tau$  es la causa última de la muerte neuronal y no el péptido A $\beta$  se apoya en los experimentos realizados por (Irizarry *et al.*, 1997) en ratones tratados con A $\beta$ ; estos ratones mostraron placas seniles y bloqueo de la LTP, implicada en procesos de aprendizaje, pero no presentaron signos neurodegenerativos. Sin embargo, el péptido A $\beta_{1-42}$  produce hiperfosforilación de  $\tau$  en los mismos residuos que se fosforilan en los ovillos neurofibrilares, dando lugar a estructuras similares a los filamentos helicoidales emparejados (PHF) (Busciglio *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 2003), además de producir neurodegeneración (Zheng *et al.*, 2002).

También se ha descrito que en neuronas de hipocampo de ratones deficientes en  $\tau$  no hay signos de degeneración en presencia del péptido A $\beta_{1-42}$  (Cairns *et al.*, 2004). Además, hay estudios en ratones transgénicos modelos de EA que expresan placas amiloides y filamentos pareados helicoidales (Lewis *et al.*, 2001) en los que se produce una mejora cognitiva sólo cuando disminuyen los niveles de A $\beta_{1-42}$  y  $\tau$ , y no cuando solo disminuye el péptido A $\beta_{1-42}$  (Oddo *et al.*, 2006). Por tanto, el conjunto de estos resultados parecen indicar que la hiperfosforilación de  $\tau$  está implicada en la muerte neuronal en la EA.

Las proteínas  $\tau$  pertenecen a una familia de proteínas asociadas a microtúbulos del citoesqueleto (MAP) cuya función principal es el ensamblaje del citoesqueleto y la polarización de las neuritas (Binder *et al.*, 1985). Recientemente, se ha descrito que también están implicadas en el control del desarrollo celular y muerte celular. Así, por ejemplo, se sabe que  $\tau$  participa mayoritariamente en los procesos de muerte celular por excitotoxicidad inducida por glutamato (Pizzi *et al.*, 1995).

En la estructura primaria de la proteína  $\tau$  se han descrito de 3 o 4 repeticiones de 31-32 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que constituyen el sitio de anclaje de los microtúbulos. La isoforma con 4 repeticiones se encuentra solo en tejido adulto sin embargo, la isoforma de 3 repeticiones se encuentra tanto en tejido fetal como en cerebro adulto (Goedert & Jakes, 1990; Hasegawa *et al.*, 1993). Las modificaciones post-transcripcionales como fosforilaciones y glicosilaciones aumentan el grado de complejidad de las estructuras formadas.

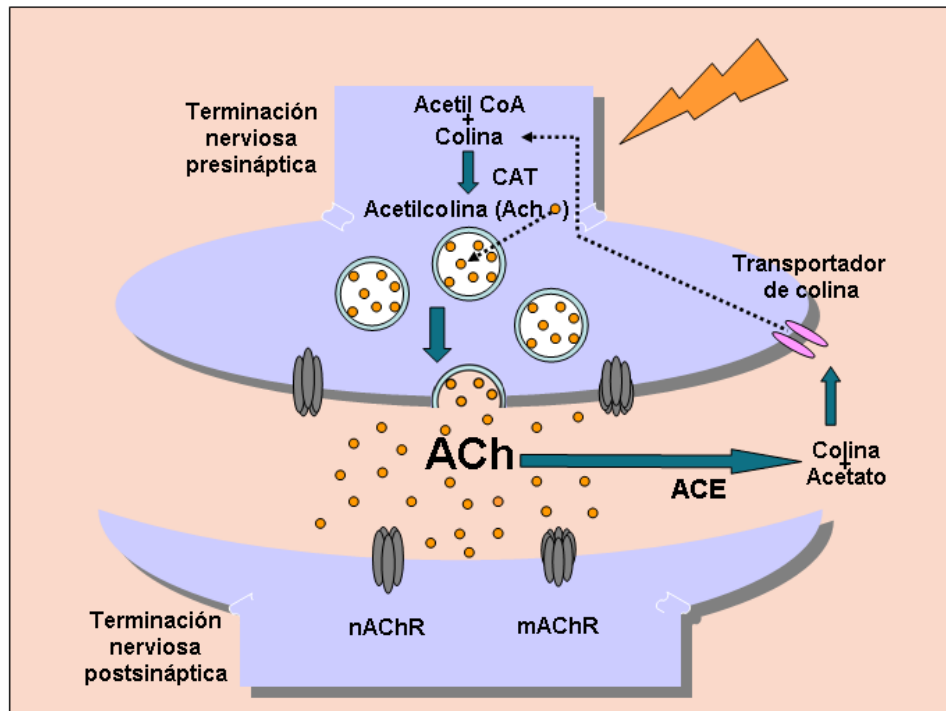
En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de filamentos helicoidales emparejados (PHF) en determinadas neuronas es una de las consecuencias histopatológicas de la enfermedad.  $\tau$  es la proteína mayoritaria de los filamentos pareados helicoidales (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1988). Además, en cerebros de EA existe un alto porcentaje de proteína  $\tau$  hiperfosforilada (Avila, 2000). Se han descrito hasta 21 sitios de fosforilación en residuos de Ser-Thr en complejos PHF- $\tau$  (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). La proteína ADP- $\tau$  no produce el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos (Alonso *et al.*, 1994) y éstos secuestran proteínas  $\tau$  normales y proteínas MAP de alto peso molecular como MAP1 y MAP2 causando el desensamblaje de microtúbulos *in vitro* (Alonso *et al.*, 1994). La desorganización de los microtúbulos y las consecuencias sobre el transporte axonal son las causas que se cree son responsables de la degeneración retrógrada de las neuronas en la enfermedad EA.

Múltiples cinasas fosforilan  $\tau$  *in vitro* en los mismos sitios que están fosforilados en enfermos de EA como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Drewes *et al.*, 1992; Ledesma *et al.*, 1992), cinasas dependientes de ciclina (cdK) (Ledesma *et al.*, 1992; Arioka *et al.*, 1993) y la glucógeno sintasa cinasa (GSK-3) (Hanger *et al.*, 1992). La inhibición de la actividad de fosfatasas que defosforilan  $\tau$ , también puede llevar a una hiperfosforilación de esta proteína. Entre éstas se encuentran las Ser/Thr fosfatasas PP-1, PP-2A y PP-2B (Gong *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995) y la actividad de las mismas se

encuentra disminuída en cerebros de pacientes de EA (Gong *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1995).

### **II.3.1.b. Disfunción colinérgica en la Enfermedad de Alzheimer**

La sinapsis colinérgica asegura su funcionalidad mediante la síntesis de acetilcolina (ACh) por acción de la enzima colinoacetilasa o colino-acetiltransferasa (CAT). Esta enzima es sintetizada en el soma de las neuronas colinérgicas siendo posteriormente transportada hacia el axón donde va a intervenir en la síntesis de ACh a partir de sus precursores fisiológicos, acetil-coenzima A y colina. La colina procede del medio extracelular, donde existe a concentraciones micromolares bajas, siendo captada hacia la terminal colinérgica por acción de un transportador, siendo por tanto éste un factor limitante en la síntesis de (ACh). La síntesis de ACh se produce en el citosol, siendo posteriormente almacenada, gracias a la acción de un transportador, en vesículas sinápticas que, mediante un proceso de exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , serán liberadas al espacio sináptico. Una vez liberada, la ACh se va a unir a receptores muscarínicos y nicotínicos presentes tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico (Fig. 4). Los receptores nicotínicos a nivel presináptico ejercen un papel modulador de la liberación de neurotransmisores, mientras que los postsinápticos median procesos de transmisión sináptica excitatoria. Además, algunos subtipos de receptores nicotínicos parecen relacionarse con procesos de plasticidad y desarrollo neuronal, así como con efectos neuroprotectores.



**Figura 4. Dibujo representativo de la sinapsis colinérgica.**

Aunque en la fisiopatología de la enfermedad del Alzheimer se han implicado diversos sistemas de neurotransmisión, el sistema colinérgico ha sido el más estudiado (Bartus *et al.*, 1982).

La gravedad de la demencia se ha relacionado no solo con la pérdida colinérgica (Perry *et al.*, 1981) sino también con la reducción de la actividad de la colino acetil-transferasa (enzima que sintetiza la ACh) (CAT) en el cortex (Coyle *et al.*, 1983; Geula & Mesulam, 1996). Sin embargo, se ha visto un aumento de la actividad de ésta enzima en las neuronas que sobreviven, lo que se interpreta como un mecanismo de defensa compensador (Slotkin *et al.*, 1990).

Las neuronas más vulnerables en la EA parecen ser las que expresan altos niveles de nAChR, en concreto, el subtipo  $\alpha 7$  (D'Andrea & Nagele, 2006). La pérdida de neuronas colinérgicas está asociada a la presencia de ovillos neurofibrilares.

Existen datos que demuestran que en los cerebros postmortem de enfermos de EA existe una pérdida de receptores nicotínicos, sobre todo en fases tempranas (Kadir et al., 2006). Estos resultados se han obtenido por técnicas de western-blot (Burghaus et al., 2000), análisis inmunohistoquímicos (Martin-Ruiz et al., 1999; Wevers & Schroder, 1999) o por técnicas de radioligandos (Nordberg & Winblad, 1986; Hellstrom-Lindahl et al., 1999). Sin embargo, otros estudios no encuentran una disminución del ARN mensajero para las distintas subunidades nicotínicas mediante técnicas de hibridación in situ o RT-PCR en pacientes de EA (Terzano et al., 1998; Mousavi et al., 2003). Estos resultados indican que hay una pérdida de la expresión proteica de las subunidades de los nAChR en estos pacientes.

Otro mecanismo que se ha relacionado con la disfunción colinérgica en la EA es la interacción del péptido  $\beta$  con los nAChR. Existen estudios que demuestran que el péptido  $A\beta_{1-42}$  se une selectivamente a los nAChR  $\alpha 7$  (Wang et al., 2000b) y esta unión se desplaza por  $\alpha$ -bungarotoxina (Wang et al., 2000a; Wang et al., 2000b) en varios modelos neuronales. La toxicidad producida por  $A\beta$ , además, está mediada en parte por su unión al subtipo  $\alpha 7$  (Qi et al., 2007). Este hecho podría ser debido a que el péptido se internaliza a través de su unión al  $\alpha 7$  (Nagele et al., 2002).

Aunque otros mecanismos pueden estar relacionados en el desarrollo de la enfermedad de EA, hay suficientes evidencias que permiten pensar que la disfunción de la neurotransmisión colinérgica desempeña un papel clave en la enfermedad. Por ello, se han realizado múltiples aproximaciones terapéuticas para contribuir a la mejora de esta disfunción.

## **II.4. LOS nAChR COMO DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS NEUROPROTECTORES**

Tomando como diana terapéutica los receptores nicotínicos y la mejora de la neurotransmisión colinérgica se han buscado precursores de la síntesis de ACh, inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), moduladores alóstericos positivos o agonistas de receptores nicotínicos.

### **II.4.1. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA**

#### **II.4.1.a. Los precursores de ACh**

La propia colina no ha mostrado resultados satisfactorios en ensayos clínicos (Amenta *et al.*, 2001). Este hecho puede ser debido a que no se ha podido demostrar que el aumento de la biodisponibilidad de colina en cerebro se correlacione con un incremento de la síntesis y/o liberación de ACh en las neuronas colinérgicas (Wecker, 1990). Sin embargo, otros fosfolípidos implicados en la síntesis de colina como CDP-colina o colina-alfoscerato sí parecen incrementar la síntesis y liberación de ACh, habiéndose descrito una pequeña mejoría de las funciones cognitivas en pacientes de EA (Caamano *et al.*, 1994; De Jesus Moreno Moreno, 2003).

#### **II.4.1.b. Los inhibidores de AChE**

Son los que hasta ahora han demostrado cierta eficacia para detener el progreso de la enfermedad de EA, evitando la degradación de la ACh. Fármacos como el donepezilo, la rivastigmina o la galantamina, que inhiben la acetilcolinesterasa cerebral, son capaces de proporcionar una mejoría modesta (Aguglia *et al.*, 2004; Ritchie *et al.*, 2004) y transitoria de la sintomatología del paciente de EA y de enlentecer modestamente el deterioro progresivo de la enfermedad (Raina *et al.*, 2008). Sin embargo, alguno de ellos como la galantamina también ha mostrado efectos adicionales a su inhibición de la

acetilcolinesterasa *in vitro* como la potenciación alostérica de los nAChR (Albuquerque et al., 1996; Schrattenholz et al., 1996; Maelicke, 2000).

#### **II.4.1.c. Los moduladores alostéricos de nAChR**

También producirían, teóricamente, una mejora de la transmisión colinérgica al aumentar la sensibilidad del neurotransmisor ACh. Así por ejemplo, la galantamina por ser un modulador alostérico positivo podría incrementar la neurotransmisión colinérgica y ser ésta la propiedad que le confiere sus efectos en la mejora de la cognición y retraso del deterioro en la enfermedad de EA, además de la inhibición de la AChE.

#### **II.4.1.d. Los agonistas nicotínicos**

Han mostrado efectos neuroprotectores en modelos *in vivo* e *in vitro* frente a la toxicidad inducida por péptido A $\beta$  (Kihara et al., 1998) y en modelos de hiperfosforilación de  $\tau$  (Arias et al., 2005). Además, existen estudios que postulan una menor neurodegeneración en pacientes fumadores de Alzheimer y menor número de placas necróticas en cerebros de fumadores, en comparación con los no fumadores (Ulrich et al., 1997). Estos resultados les hace un buen objeto de estudio para sus posibles propiedades terapéuticas en la EA.

#### **II.4.2. MECANISMOS NEUROPROTECTORES MEDIADOS POR nAChR**

Aunque los efectos neuroprotectores de los agonistas nicotínicos están bien establecidos, existen múltiples teorías acerca de cuales pueden ser los mecanismos por los cuales pueden ofrecer dicha neuroprotección, que a continuación los describimos.



#### **II.4.2.a. Disminución de la muerte celular**

En neuronas de hipocampo y corteza tratadas con el péptido  $A\beta$  (Zamani *et al.*, 1997; Liu & Zhao, 2004) (Kihara *et al.*, 1997; Kihara *et al.*, 1998) y en ratones transgénicos modelos de EA se ha demostrado que diversos agonistas nicotínicos neuroprotegen y disminuyen la hiperfosforilación de  $\tau$  (Hu *et al.*, 2008; Bitner *et al.*, 2009).

También se sabe que los agonistas nicotínicos pueden activar una serie de procesos mediante la activación de protein-quinasas, iniciación de genes tempranos y síntesis de nuevas proteínas, que en última instancia, llevarían a cambios de plasticidad sináptica, remodelado neuronal e inhibición de apoptosis. A este respecto, hay datos que sugieren que la señal ocasionada por la activación de receptores nicotínicos  $\alpha 3$  puede regular la expresión de factores tróficos (Belluardo *et al.*, 2000), de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Kihara *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2005), e incluso de proteínas fijadoras de  $Ca^{2+}$  como la calbindina D28K (Prendergast *et al.*, 2001); todos estos eventos podrían explicar el efecto neuroprotector/trófico secundario a la activación de los receptores nicotínicos.

#### **II.4.2.b. Aumento del número de nAChR**

El efecto neuroprotector de los agonistas nicotínicos también podría relacionarse con una sobreexpresión de nAChR que compensarían la pérdida de nAChR característica de la EA. Así se ha demostrado que la nicotina produce aumentos de la expresión de estos receptores en cerebro y cultivos celulares (Gentry & Lukas, 2002). En cultivos celulares, mediante incubaciones por encima de 120 h, la nicotina ha mostrado la capacidad de aumentar los receptores  $\alpha 7$  en membrana sin afectar a la expresión del ARNm (Ke *et al.*, 1998). En cerebros de rata sometidos a largos tratamientos con nicotina,

se ha visto que aumenta la expresión del subtipo  $\alpha 7$  restringida a determinadas regiones cerebrales (Nguyen *et al.*, 2003).

Jonnala y Buccafusco, en células privadas de factores tróficos demostraron que la nicotina produjo neuroprotección y duplicó el número de sitios de fijación para [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -bungarotoxina. Por el contrario, otros agonistas que no ofrecían efectos neuroprotectores, tampoco aumentaban el número de nAChR.

#### **II.4.2.c. Disminución de la secreción y agregación de A $\beta$**

Otro posible mecanismo neuroprotector mediado por la activación de los nAChR podría ser porque aumentan la secreción de fragmentos de APP no amiloidogénico *in vitro* (Efthimiopoulos *et al.*, 1996; Kim & Suh, 1996). Además, la administración crónica de nicotina puede bloquear el procesamiento de APP en péptidos A $\beta$  *in vivo* mediante un mecanismo dependiente de nAChR.

La caracterización de las propiedades neuroprotectoras de los distintos subtipos de nAChR está emergiendo en los últimos años debido a la aparición de nuevos agonistas y moduladores selectivos así como la utilización de técnicas de silenciamiento para las distintas subunidades de estos receptores.

#### **II.4.3. SUBTIPOS DE nAChR IMPLICADOS EN LA NEUROPROTECCIÓN**

La protección por estimulación de los nAChR puede ser mediada por varios subtipos y además difiere según los tóxicos (Gahring 2003) y los tipos celulares empleados.

Los efectos neuroprotectores de la nicotina frente a la toxicidad inducida por A $\beta$  e hiperfosforilación de  $\tau$  (Arias *et al.*, 2005) se revierten con antagonistas selectivos  $\alpha 7$  y no selectivos como la mecamilamina (Kihara *et al.*, 1998; Liu & Zhao, 2004); y no con antagonistas  $\beta 2$  (Arias *et al.*, 2005) , sugiriendo que la activación del subtipo  $\alpha 7$  es la

responsable del efecto neuroprotector. Sin embargo, en otros modelos de toxicidad como la mediada por etanol, en neuronas corticales, el efecto protector de la nicotina se revirtió tanto con antagonistas selectivos  $\alpha 7$  como  $\beta 2$  (Tizabi *et al.*, 2004). El silenciamiento del subtipo  $\alpha 7$  en SHSY-5Y produce un incremento de la toxicidad por péptido A $\beta$  (Qi *et al.*, 2007) y los antagonistas  $\alpha 7$  y no los  $\beta 2$ , revierten la protección de galantamina en cultivos neuronales de rata (Kihara & Shimohama, 2004).

Por todo esto, parece que el nAChR del subtipo  $\alpha 7$  desempeña un papel primordial en la neuroprotección inducida por la estimulación de receptores nicotínicos, aunque en algunos tipos celulares, los nAChR no- $\alpha 7$  también pueden contribuir a este efecto.

#### **II.4.4. IMPLICACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN EL MECANISMO NEUROPROTECTOR MEDIADO POR nAChR.**

La nicotina y otros agonistas o moduladores alostéricos de los nAChR han mostrado neuroprotección en varios modelos de toxicidad neuronal, tanto *in vitro* como *in vivo* (O'Neill *et al.*, 2002). Aunque las rutas intracelulares que median estos efectos neuroprotectores no son totalmente conocidas, la creencia de que la neuroprotección es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente (Donnelly-Roberts *et al.*, 1996; Dajas-Bailador *et al.*, 2000; Ferchmin *et al.*, 2003) está ampliamente extendida. Sin embargo, existen estudios en los que se empieza a dudar de si la protección mediada por nAChR puede ser debida a un cambio conformacional del receptor y activación de cinasas acopladas a éste o por una mera desensibilización del receptor (Buckingham *et al.*, 2009). Estas hipótesis se basan en que el bloqueo de receptores mediante la utilización de antagonistas selectivos  $\alpha 7$  también producen protección en rodajas de hipocampo (Ferchmin *et al.*, 2003) sometidas a daño por NMDA, en neuronas corticales de ratón frente a A (Martin *et al.*, 2004) y una disminución de la hiperfosforilación de  $\tau$  inducida por A $\beta$  en células SHSY-5Y y PC12 (Hu

*et al.*, 2008). Además, la co-incubación de agonistas y antagonistas selectivos  $\alpha 7$  no produce un efecto sinérgico en la disminución de la hiperfosforilación de  $\tau$ .

Existen estudios en neuronas de ratones que expresan la subunidad  $\alpha 7$  que demuestran que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  es tóxica (Laudenbach *et al.*, 2002). Se sabe que el péptido  $\beta$  produce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del subtipo  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 2$  en SHSY-5Y (Dajas-Bailador *et al.*, 2002a). La desensibilización previa de éstos nAChR podría dar lugar a una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del nAChR en presencia del péptido  $\beta$  que evitaría la toxicidad inducida por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Recientemente se ha relacionado una mejora cognitiva en macacos tratados con nicotina y análogos de colina tras la desensibilización de los nAChR (Buccafusco *et al.*, 2009b).

Por otro lado, el hecho de que la neuroprotección mediada por nicotina se dé a altas concentraciones sugiere que sus efectos neuroprotectores estarían relacionados con la desensibilización del receptor (Buckingham *et al.*, 2009).

La gran pregunta que nos planteamos actualmente es si el mecanismo de neuroprotección por agonistas nicotínicos se debe a un cambio conformacional o desensibilización del receptor que active una vía de señalización intracelular protectora (se sabe que el subtipo  $\alpha 7$  interacciona físicamente con cinasas señalizadoras) o si se precisa del paso de  $\text{Ca}^{2+}$  a su través, o ambos a la vez.

#### **II.4.5. CINASAS ACTIVADAS POR nAChR Y SU IMPLICACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE RUTAS DE SUPERVIVENCIA**

Existen múltiples cinasas implicadas en la neuroprotección mediada por agonistas nicotínicos. Algunas de ellas se sabe que son activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , pero además existen otras que se encuentran asociadas físicamente al propio receptor pudiéndose activar por un cambio conformacional del mismo.

Entre las enzimas que están acopladas al nAChR  $\alpha 7$  se encuentra, entre otras, la JAK-2 (Shaw *et al.*, 2002). Ésta es una proteína que se puede autofosforilar, activándose y es capaz de mediar la activación entre el nAChR y PI3K (Kumano *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2002). Además, se sabe que la activación de JAK-2 inducida por nicotina en células PC12 es responsable de la protección ofrecida por ésta en presencia del péptido A $\beta$  1-42 (Shaw *et al.*, 2002).

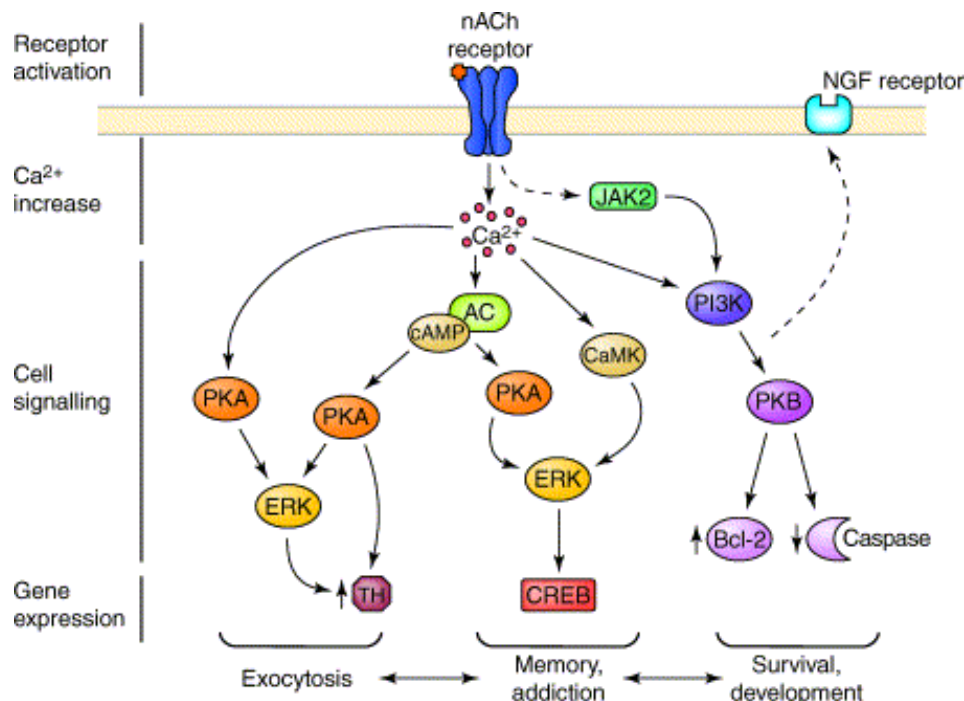
De las cinasas que se activan por una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  cabe destacar la proteína ERK 1/2, proteína quinasa A (PKA) (Dajas-Bailador *et al.*, 2002b), proteína cinasa C (PKC),  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina cinasa-II (CAMK-II) y fosfoinositol-3-cinasa (PI3K).

Las dos cinasas más importantes y que se relacionan con efectos neuroprotectores mediados por agonistas nicotínicos en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* son la proteína cinasa B o Akt y la ERK 1/2. La primera de ellas, Akt, se activa cuando la cinasa PI3K transforma el PIP2 en fosfoinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3), que es capaz de reclutar por una parte a Akt, y, por otra, a PDK1 (del inglés “phosphoinositide-dependent kinase 1”) (Franke *et al.*, 1997). En estas condiciones, la PDK1 fosforila a Akt en 2 residuos (Thr 308 y Ser 473) y la activa. Una vez activada, Akt es capaz de fosforilar a múltiples proteínas en residuos de serina o treonina, asumiendo un papel clave en distintos procesos celulares tales como el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular o la supervivencia celular. De las múltiples proteínas que Akt es capaz de fosforilar en relación con la supervivencia celular, cabe destacar a BAD, caspasa-9 y GSK-3 $\beta$ . Además también se ha visto que está implicada en la ruta de señalización intracelular que desencadena un aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Arias *et al.*, 2004).

La enzima GSK-3 (del inglés “glycogen synthase kinase”) existe en tres isoformas que son GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  y GSK-3 $\beta 2$  (Grimes & Jope, 2001). Su actividad se controla por fosforilación, así que puede ser reducida por la fosforilación de una Ser en la posición 9, o puede ser aumentada por una fosforilación en una Tyr en la posición 216 (Grimes & Jope, 2001). Akt es capaz de fosforilar a GSK-3 $\beta$  en su posición Ser-9, inactivándola (Cross *et*

*al.*, 1995). Por otro lado, determinadas tirosina cinasas como la ZAK-1 y Fyn o aumentos en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden activar la enzima a través de la fosforilación de la tirosina 216 y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) a través de la defosforilación de la Ser 9 (Grimes & Jope, 2001).

Otra cinasa que se relaciona con efectos neuroprotectores es ERK 1/2. Esta cinasa pertenece a la familia de las MAPK (del inglés “mitogen-activated protein kinases”). Para la activación de ERK 1/2 es necesaria la activación consecutiva de otras 3 cinasas de la ruta de señalización de las MAPKs: Ras-Raf-MEK1/2. Una vez activada, la MEK1/2 (del inglés “MAP/ERK kinase 1/2”), fosforila los residuos de Thr y Tyr en la secuencia Thr-Glu-Tyr de ERK 1/2 y la activa. Una vez activada, ERK 1/2 fosforila muchos sustratos, incluyendo factores de transcripción como CREB. Así, la activación de distintas rutas de señalización es necesaria para la prevención de la muerte neuronal, aunque no existe consenso sobre qué ruta intracelular es la que predomina.



**Figura 5. Señalización intracelular de cinasas activadas por nAChR de forma  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente e independiente (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004).**

### III. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido identificar cómo participan los diferentes subtipos de receptores nicotínicos a la regulación de la homeostasis intracelular del calcio, el control de la liberación de catecolaminas y los fenómenos de neuroprotección. A continuación se describen los objetivos parciales

1.- **Determinar la contribución de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  a la regulación de los niveles de calcio intracelular y secreción de catecolaminas en células cromafines bovinas.**

- Caracterizar las señales de calcio mediadas por activación de receptores  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .
- Determinar y caracterizar la modulación alostérica del receptor nicotínico  $\alpha 7$ .
- Determinar la contribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, del retículo endoplasmático y de la mitocondria en los incrementos de calcio citosólico mediado tras la activación de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .
- Estudiar cómo la activación estos receptores regula la secreción diferencial de adrenalina y noradrenalina.

2.- **Determinar cual es la participación de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  a los procesos de neuroprotección en un modelo de hiperfosforilación de tau en células de neuroblastoma SH-SY5Y.**

- Determinar si la activación de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , no- $\alpha 7$  y/o la modulación alostérica de los receptores  $\alpha 7$  pueden proteger las células ante la toxicidad inducida por ácido okadaico.
- Analizar las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares mediadas tras la activación de los distintos subtipos de receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , no- $\alpha 7$ .
- Determinar la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en los fenómenos de protección asociados a cada subtipo de receptor.
- Analizar las vías intracelulares de señalización que participan en los procesos protectores mediados tras la activación de receptores  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. CULTIVOS CELULARES**

Para desarrollar los objetivos de esta tesis hemos empleado dos tipos celulares: (1) cultivos primarios de células cromafines bovinas y (2) la línea tumoral de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A continuación pasamos a describir sus características y condiciones de cultivo y mantenimiento.

#### **IV.1.1. CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**

##### **IV.1.1.a. Origen y características**

Las células cromafines de las glándulas adrenales de los mamíferos presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas postganglionares (Douglas, 1968). Ambas derivan de la cresta neural y liberan catecolaminas en respuesta a la estimulación por ACh. Las semejanzas funcionales entre neuronas simpáticas y células cromafines son grandes. Estas células poseen CCVD de los subtipos L, N y P/Q (Garcia *et al.*, 2006) y también presentan receptores de  $IP_3$  y receptores de rianodina.

En estas células se han caracterizado receptores nicotínicos que contienen las subunidades  $\alpha 3$  (Criado *et al.*, 1992),  $\alpha 5$  (Campos-Caro *et al.*, 1997),  $\alpha 7$  (Garcia-Guzman *et al.*, 1995) y  $\beta 4$  (Campos-Caro *et al.*, 1997), las cuales pueden agruparse y formar distintos subtipos de nAChR.

Las células cromafines bovinas además de poseer nAChR, (Douglas & Rubin, 1961; Wilson & Kirshner, 1977; Barbara & Takeda, 1996) cuentan también con mAChR (Douglas & Rubin, 1961) sobre los que actúa la ACh liberada. Además, disparan potenciales de acción (Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro & Ritchie, 1980), poseen canales de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  sensibles a voltaje (Fenwick *et al.*, 1982; Artalejo *et al.*,



1987), exhiben facilitación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por prepulsos despolarizantes repetidos (Fenwick *et al.*, 1982; Hoshi *et al.*, 1984), y emiten prolongaciones al co-cultivarlas con astrogliá (Uceda *et al.*, 1995) o al exponerlas al factor de crecimiento nervioso (Unsicker *et al.*, 1980). Y, al igual que las neuronas del sistema nervioso autónomo simpático, las células cromafines están controladas por nervios procedentes de la médula espinal.

Ya desde 1977 se agruparon a las células neuroendocrinas con propiedades similares a las neuronas, y a las células nerviosas con características endocrinas, bajo el término de “paraneurona”. Aunque, en términos estrictos no son auténticas neuronas, se encuentran relacionadas con éstas en términos de estructura, función y metabolismo (Fujita, 1977). Las células cromafines pueden considerarse como paraneuronas ya que cumplen los siguientes requisitos:

- Sintetizan neurotransmisores o productos relacionados con éstos (adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y serotonina).
- Poseen vesículas sinápticas y/o vesículas de secreción (donde se almacenan los neurotransmisores sintetizados).
- Secretan, en respuesta a estímulos adecuados, neurotransmisores que actúan sobre receptores situados en la membrana celular.

En base a estos datos, y al hecho de que puedan ser aisladas y mantenidas en cultivo con facilidad (Livett, 1984), se justifica su empleo como modelo neuronal. Además, y debido a que son accesibles a los análisis bioquímicos, a que la conexión esplácnico-cromafín es sencilla ya que son esféricas y no tienen dendritas, mucho de lo que se conoce sobre la producción y la secreción de neurotransmisores cerebrales ha sido establecido a través de estudios realizados en células cromafines.

#### **IV.1.1.b. Preparación del cultivo primario de células cromafines bovinas**

Las glándulas adrenales de ganado bovino se obtienen de un matadero local y se transportan en solución Locke a pH 7,4 y 4°C. Las células cromafines de la médula adrenal bovina se aislaron mediante un procedimiento previamente descrito (Almazan *et al.*, 1984; Livett, 1984) con las modificaciones introducidas por Moro en 1990. Con este procedimiento se obtuvieron poblaciones de células cromafines mixtas, adrenérgicas (alrededor del 80%) y noradrenérgicas (alrededor del 20%). El recuento del número total de células se realizó en una cámara de Neubauer.

Con el fin de eliminar al máximo la posible contaminación de células endoteliales, se realizó una siembra diferencial. Para ello, la suspensión de células recién aisladas se depositó en placas Petri de 15 cm de diámetro durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se recogió el sobrenadante conteniendo, mayoritariamente, las células cromafines. Las células se sembraron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal, antibióticos (50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina) e inhibidores del crecimiento de células endoteliales (5-fluoro-2-deoxiuridina 10 µM arabinósido de citosina 10 µM, y L-leucina metil éster 10 µM).

Las células se mantuvieron en una estufa a 37°C en atmósfera de aire (95%) y CO<sub>2</sub> (5%), saturada de humedad. A las 24 horas, el medio de cultivo se sustituyó por DMEM nuevo sin suero, suplementado con antibióticos. En adelante se renovó cada tres días; de este modo las células se pudieron mantener en buenas condiciones durante al menos una semana. Los experimentos se realizaron entre los días 1 y 4 después del aislamiento, momento en el que las células estaban en un estado óptimo para su uso.

#### IV.1.2. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

El uso de líneas celulares para el estudio de funciones neuronales se ha convertido en los últimos años en una alternativa a los cultivos primarios neuronales. La línea celular SH-SY5Y constituye un sistema ampliamente utilizado para el estudio de mecanismos de muerte neuronal y la identificación de nuevos compuestos neuroprotectores.

##### IV.1.2.a. Origen y características

Las células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y son derivadas de neuronas simpáticas, que sintetizan y almacenan noradrenalina (Biedler *et al.*, 1973). La secreción de este neurotransmisor está mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a estímulos despolarizantes, muscarina, nicotina o bradiquinina (Vaughan *et al.*, 1993a; Vaughan *et al.*, 1993b). Estas células poseen CCDV de los subtipos L y N (Morton *et al.*, 1992; Reeve *et al.*, 1994) y no se ha demostrado la funcionalidad de CCDV de tipo P/Q (Kukkonen *et al.*, 1997). También presentan receptores de  $\text{IP}_3$  y receptores de rianodina (Mackrill *et al.*, 1997; van Acker *et al.*, 2000). Además, mediante mecanismos acoplados a fosfolipasa C e  $\text{IP}_3$  liberan  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático (Mei *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 2001).

En esta línea celular se han caracterizado receptores nicotínicos formados por las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  (Peng *et al.*, 1994; Gentry & Lukas, 2002), las cuales pueden agruparse y formar distintos subtipos de nAChR. En estudios de inmunoprecipitación se ha demostrado que en las células SH-SY5Y, el 56% de los receptores del subtipo  $\alpha 3$  contienen también la subunidad  $\beta 2$  (Gerzanich *et al.*, 1998). También se han descrito en estas células receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha 7$  (Ridley *et al.*, 2002).

#### **IV.1.2.b. Cultivo y mantenimiento de la línea celular**

Las células SH-SY5Y se mantuvieron en cultivo en monocapa en una botella de 75 cm<sup>2</sup> con tapón ventilado (Iwaki). El medio de cultivo utilizado fue DMEM con alta concentración de glucosa (4500 mg/l) (GIBCO-Invitrogen), enriquecido con un 10% de suero bovino fetal (GIBCO-Invitrogen), 2 mM de L-Glutamina (GIBCO-Invitrogen), aminoácidos no esenciales (en g/l: 8,9 Ala, 13,2 Asn, 13,3 Asp, 14,7 Glu, 7,5 Gly, 11,5 Pro y 10,5 Ser; GIBCO-Invitrogen) y antibióticos (50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin; GIBCO-Invitrogen). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una atmósfera de aire (95%) y CO<sub>2</sub> (5%), saturada de humedad. El medio de cultivo se sustituyó cada 2 días por medio de cultivo fresco, y cuando las células alcanzaban confluencia (70-80%), se despegaban añadiendo tripsina-EDTA, para dividir el número total de células en varias placas de cultivo. Los pases se realizaron en una proporción 1:3 y las células se utilizaron entre los pases 4 a 13.

Para su almacenamiento y conservación, las células se congelaron en N<sub>2</sub> líquido (-173°C) en DMEM con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

### **IV.2. DETERMINACIÓN DE SEÑALES DE Ca<sup>2+</sup> INTRACELULARES**

#### **IV.2.1. MEDIDA DE SEÑALES DE [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES EN POBLACIONES CELULARES.**

Las células SH-SY5Y o cromafines bovinas se sembraron en placas negras de 96 pocillos. Las células SH-SY5Y se sembraron de forma que la densidad el día en que se realizaban las medidas era de aproximadamente 200.000 células por pocillo. Las células cromafines bovinas se sembraron a una densidad de 100.000 células por pocillo. Ambos tipos celulares se cargaron con la sonda Flúo-4-AM durante 1h a 37°C

en Krebs-HEPES (140mM NaCl, 5,6mM KCl, 1,2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 11mM D-glucosa pH 7,4). A continuación, se lavaron las células con Krebs HEPES durante 15 minutos dos veces. En el último lavado se incubaron los diferentes tratamientos según el protocolo experimental. Las placas se midieron en un lector de fluorescencia FLUOstar Optima (BMG, Alemania) a una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. Este equipo permite inyectar los agonistas nicotínicos y hacer un curso temporal de las variaciones de fluorescencia. Según los experimentos, la fluorescencia se registró durante 10 segundos o 5 minutos. Al final del experimento, se añadieron 75 µl de tritón al 5% para la obtención de la fluorescencia máxima en cada pocillo ( $F_{\max}$ ) y después 50 µl de MnCl<sub>2</sub> 1 M para la obtención de la fluorescencia mínima ( $F_{\min}$ ). Con los datos obtenidos aplicamos la fórmula  $[F \text{ (fluorescencia registrada)} - F_0] / (F_{\max} - F_{\min})$ . Siendo  $F_0$  el punto de fluorescencia menor obtenido a lo largo de toda la medida.

#### **IV.2.2. MEDIDA DE SEÑALES DE Ca<sup>2+</sup> CITOSÓLICO Y MITOCONDRIAL MEDIANTE EL EMPLEO DE AEQUORINAS.**

Las células cromafines bovinas se sembraron en cubres a una densidad de 500.000 células en placas de 24 pocillos. Para que expresaran las aequorinas dirigidas al citosol y la mitocondria, las células fueron infectadas con adenovirus (Rizzuto *et al.*, 1992; Rizzuto *et al.*, 1995) que contienen en su genoma la secuencia que codifica para estas proteínas. Los adenovirus se prepararon según describió Santodomingo en 2008. Las células se infectaron el día posterior a la siembra y las medidas de Ca<sup>2+</sup> se realizaron entre las 48-72 h posteriores al proceso de infección. Para la reconstitución de las aequorinas, las células se incubaron con 1 µM de coelenterazina durante 1-4 h en medio Krebs-HEPES.

Las células se introdujeron en una cámara de perfusión acoplada a un luminómetro, a 37°C, donde comenzaron a realizarse las medidas de Ca<sup>2+</sup> mediante la

aplicación de pulsos consecutivos de agonistas nicotínicos. La transformación de los valores de luminiscencia obtenidos a  $[Ca^{2+}]_c$  o  $[Ca^{2+}]_m$  se determinó mediante el uso del algoritmo descrito por Barrero en 1997 .

#### **IV.3. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

Las células cromafines bovinas se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 500.000 células/pocillo. Se pre-incubaron con los antagonistas el modulador o con la solución control Krebs-HEPES durante 5 minutos y, a continuación, se estimularon con los agonistas nicotínicos durante 30 segundos. Cada variable se hizo por duplicado. Se recogió el medio extracelular que contenía las catecolaminas secretadas por la acción de los distintos agonistas, el cual se analizó en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, Agilent Technologies 1200 series) usando un gradiente electroquímico (BIORAD modelo 1640). Se utilizó una columna C18 en fase reversa (ZORBAX Eclipse XDB, Agilent Technologies), por la que se eluyó una fase móvil (pH 4; 0,1M acetato de sodio, 0.1 M ácido cítrico, 0.7 mM octylsulfato sódico y 0.57mM EDTA con 10% v/v de metanol). El sistema se diluyó continuamente con la fase móvil que se recicló en un reservorio y se usó durante más de una semana. La velocidad del flujo fue de 1ml/min con una presión de 2200 psi. Los potenciales de los electrodos de referencia frente a  $H_2/H^+$  fueron: el electrodo condicionado 0.4V; electrodo pre-oxidado +0,10V; electrodo de trabajo +0,35V

La concentración de adrenalina y noradrenalina se calculó mediante una curva de calibrado. Los cromatogramas fueron recolectados y procesados con el Clinical Data Management Software (BIORAD CDM 1.10)

#### IV.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR

Uno de los motivos que dificultan la evaluación y búsqueda de fármacos eficaces a nivel de experimentación básica en el estudio de la EA es la inexistencia de un modelo que remede de forma fidedigna su origen multifactorial. En el caso de los estudios *in vitro* son claves para que los resultados obtenidos tengan cierta validez, el tipo de cultivo celular, los agentes citotóxicos, y el protocolo de aplicación del tratamiento utilizado.

##### IV.4.1. ESTÍMULO CITOTÓXICO: ÁCIDO OKADAICO

El empleo del ácido okadaico (AO) como inductor de muerte celular se considera un modelo *in vitro* de hiperfosforilación de  $\tau$  que reproduce características histopatológicas de la EA. En células SH-SY5Y, la incubación con 30 nM de AO ocasiona una disminución de la actividad de las fosfatasa PP-1 y PP-2A en un 60% y 100% respectivamente en aplicación aguda (Tanaka *et al.*, 1998) .

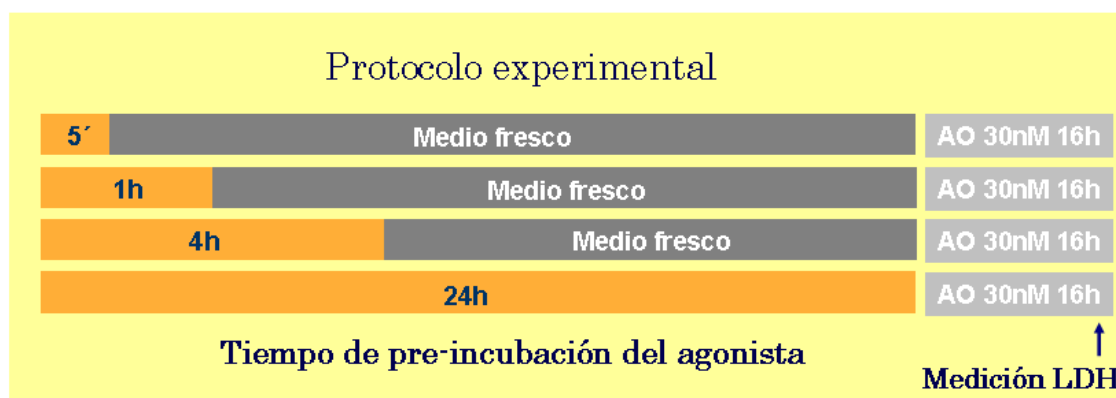
El AO aumenta la fosforilación de  $\tau$  en Ser-396/404 (sitio de fosforilación de GSK-3 $\beta$ ) e induce muerte celular parcialmente por la desestabilización de los microtúbulos de tubulina del citoesqueleto (Tanaka *et al.*, 1998). Este sitio de fosforilación también se da en neuronas y células de neuroblastoma tratadas con fibrillas de A $\beta$  (Busciglio *et al.*, 1995), péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> (Shea, 1997) y A $\beta$ <sub>1-40</sub> (Lee *et al.*, 1997)

La desestabilización de los microtúbulos y la consecuente disminución del transporte axoplásmico se cree que es el responsable de la degeneración retrógrada (Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1997) y la muerte de las neuronas en pacientes de EA.

Por otro lado, la defosforilación de  $\tau$  *in vitro* por las fosfatasa PP-2A y PP1 hace que  $\tau$  recupere su actividad biológica (Gong *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995).

#### IV.4.2. PROTOCOLOS DE APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Para determinar las acciones neuroprotectoras de los agonistas nicotínicos, éstos se pre-incubaron 24 horas antes de exponer las células al estímulo tóxico (AO 30 nM durante 16 horas). Durante el estímulo tóxico el agonista no estaba presente. Asimismo, para determinar el tiempo mínimo necesario para que los agonistas produjeran su máxima neuroprotección éstos se incubaron 5 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas. A continuación, se retiró el agonista y se añadió DMEM hasta completar 24 horas. Finalizado este tiempo se añadió AO que estuvo presente durante 16 horas (Fig. 6).



**Figura 6. Protocolo experimental empleado para evaluar el tiempo de incubación necesario para obtener un efecto neuroprotector significativo con los agonistas nicotínicos.**

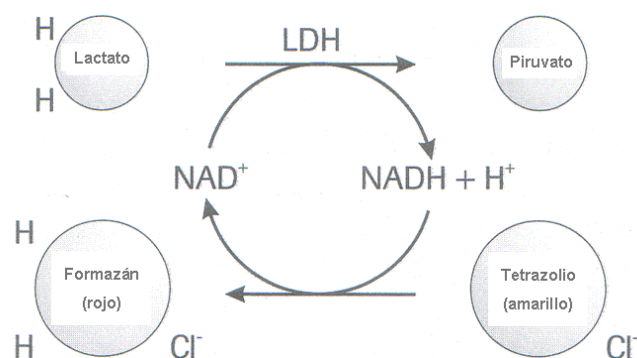


#### **IV.4.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LÁCTICO DESHIDROGENASA COMO PARÁMETRO DE MUERTE CELULAR.**

Cuantificamos la actividad enzimática de la láctico deshidrogenasa (LDH) liberada a la solución de incubación como marcador general del daño celular (Koh & Choi, 1987) (Fig. 7).

Uno de los parámetros generales que definen la muerte celular está relacionado con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. La LDH es una enzima citoplásmica estable que, ante un daño en la membrana celular, sale al medio externo. De ésta forma podemos realizar una medida indirecta del estado del cultivo, comparando la actividad de la LDH liberada en el medio extracelular con respecto a la LDH intracelular que permanece en las células viables. Este segundo parámetro lo obtenemos sustituyendo el medio de cultivo por otro medio que contiene Tritón-X100 al 1% durante 30 minutos para asegurar la liberación total de la LDH que permanecía en las células no dañadas.

La valoración de esta enzima se ha realizado mediante un kit comercial (Cytotoxicity detection kit-LDH; Roche). Para ello, las células se sembraron en placas de plástico estériles de 48 pocillos (100.000 células/pocillo), se mantuvieron en el incubador durante 24 horas antes de iniciar el experimento, tiempo suficiente para facilitar la adhesión de las células a la superficie de cultivo. Posteriormente, siguiendo el protocolo, se expusieron a los diferentes tratamientos. Las muestras se analizaron colorimétricamente en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado (490 nm) y obteniendo los valores de absorbancia mediante el programa DeltaSOFTII Versión 3.71 EMS. La muerte celular se expresa como el % de LDH liberada al medio extracelular respecto de la LDH total ( $LDH_e + LDH_i$ ).



**Figura 7: Principio del ensayo de detección de citotoxicidad a través de la valoración indirecta de la actividad de la enzima LDH.**

#### **IV.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE WESTERN BLOT**

Realizamos mediante western-blot la cuantificación de los cambios en la fosforilación y expresión de proteínas. Los lisados celulares se obtuvieron de cultivos sembrados en placas de 48 pocillos a una densidad de 100.000 células/pocillo. Una vez finalizado el tratamiento correspondiente en cada caso por cuádruplicado, se despegaron las células y se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 10 minutos. A continuación se disolvió el pellet en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NP-40 1%, SDS 0,1%, deoxicolato sódico 0,2%) con inhibidores de proteasas (Complete cocktail tablets, Roche). Se incubaron durante 30 minutos a 4°C y centrifugamos a 12000 xg en microcentrífuga (ALC 4224) durante 2 minutos. Se recogió el sobrenadante, que contenía las proteínas solubilizadas por el tampón de lisis, y se determinó la concentración de proteínas totales (BCA Protein Assay Kit; Pierce).

Para realizar la electroforesis de proteínas seguimos un método ampliamente descrito (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles de SDS-poliacrilamida concentradores del 3% y geles separadores de poliacrilamida de porcentaje variable (6, 8, 10%), en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Como tampón de carga: Tris-

HCl 25 mM pH 6,8, DTT 7%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%. Utilizamos marcadores de peso molecular coloreados ColorBurst™ de Sigma-Aldrich. Posteriormente se realizaron los experimentos de transferencia e inmunomarcado.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) durante 2h a 4°C con una corriente de 70 mA. Se saturó la membrana durante 2h con BSA al 5% en TBS-T (10mM Tris, pH 7.4; 150mM NaCl; 0.2% Tween-20), con objeto de bloquear uniones inespecíficas.

Las membranas se incubaron posteriormente durante 2 horas con los distintos anticuerpos primarios específicos diluidos en TBS-T con BSA al 0,5% : Anti-P-Tyr-211-JAK-2, Anti-JAK-2, Anti-P-Thr-308-Akt, Anti-Akt, Anti-P-Ser-9-GSK3-β, Anti-P-Tyr-216-GSK3β y Anti-GSK-3β a 1:1000 de Cell signaling (Izasa S.A., Barcelona, Spain), Anti-Thr-202/Tyr-204-P-ERK y ERK 1/2 a (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Alemania), Anti-β-actina a 1:100.000 de SIGMA (Madrid, España); Anti-P-Ser-396/404-Tau y Anti-Tau a 1:1000 facilitados por Jesús Ávila.

Las membranas se lavaron tres veces en TBS-T y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con los respectivos anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (Anti-ratón conjugado con peroxidasa; Santa Cruz (1:10000); Anti-conejo conjugado con peroxidasa; Santa Cruz (1:10000) diluidos en TBS-T con BSA al 0,5%.

Finalmente se empleó un método quimioluminiscente para el revelado en el cual la peroxidasa cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ECL; Amersham).

La cuantificación de bandas se realizó mediante densitometría usando el programa de análisis de imagen Scion Image®.

#### **IV.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los resultados que se recogen en este trabajo se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (s.e.m.). Para analizar el efecto de los distintos tratamientos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía; posteriormente los datos se compararon mediante el test post-hoc (Newman-Keuls). Estos cálculos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con p menor de 0,05.

Los estudios obtenidos en los experimentos de aequorinas, se utilizó una t de Student para determinar las diferencias estadísticas entre grupos. Igualmente se consideraron estadísticamente significativos los resultados con p menor de 0,05.

## V. RESULTADOS

### V.1. CARACTERIZACIÓN DE SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES Y SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS MEDIADAS POR nAChR $\alpha 7$ y no- $\alpha 7$ EN LA CÉLULA CROMAFÍN BOVINA.

Hemos empleado diversos agonistas y antagonistas de los nAChR en células cromafines bovinas cargadas con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 o transfectadas con una aequorina dirigida al citosól que, tras unir  $\text{Ca}^{2+}$ , emite luz. Los niveles de catecolaminas liberadas al medio extracelular se han detectado mediante HPLC. Los resultados obtenidos se describen a continuación:

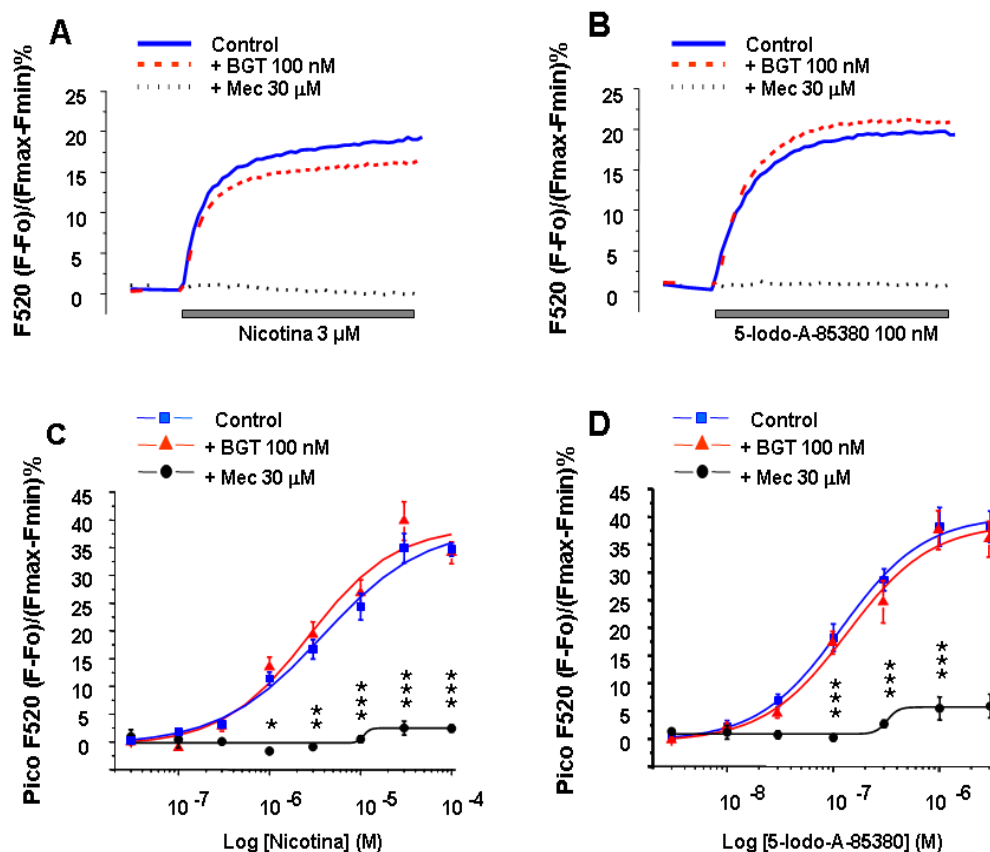
#### V.1.1. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES INDUCIDAS POR NICOTINA Y

##### 5IA85380: LA RESPUESTA NO- $\alpha 7$ .

En primer lugar realizamos curvas concentración-respuesta con los agonistas nicotínicos nicotina y 5-Iodo-A-85380 (5IA85380), en células cromafines cargadas con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4, para evaluar aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. Como muestra la figura 8C, la nicotina (0,03 a 100  $\mu\text{M}$ ) produjo incrementos de la fluorescencia dependientes de la concentración del agonista con un valor de  $\text{EC}_{50}$  de  $3,73 \pm 0,71 \mu\text{M}$ . Cuando las células se pre-incubaron con el antagonista selectivo  $\alpha 7$ ,  $\alpha$ -bungarotoxina (BGT), las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por nicotina no se vieron modificadas (Fig. 8C). Sin embargo, al pre-incubar las células con el antagonista inespecífico mecamilamina, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por nicotina se bloquearon por completo.

Con el propósito de corroborar estos resultados, a continuación medimos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por concentraciones crecientes del agonista nicotínico 5IA85380. Este agonista presenta gran afinidad por los subtipos de receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 6\beta 2$  (ver Introducción Tabla I). En células cromafines bovinas, se puede descartar la presencia de los subtipos  $\beta 2$ , ya que esta subunidad no ha sido identificada

en este modelo. Por tanto, el 5IA85380 estaría estimulando preferentemente al subtipo  $\alpha 3\beta 4^*$  con una afinidad cinco veces superior al del subtipo  $\alpha 7$  (Mukhin *et al.*, 2000). El 5IA85380 produjo un incremento de la fluorescencia a medida que aumentaba la concentración de agonista (0,003-3  $\mu$ M) con una  $EC_{50}$  de  $0,11 \pm 0,01 \mu$ M. (Fig. 8D)



**Figura 8. Señales de  $Ca^{2+}$  intracelulares inducidas por nicotina y 5IA85380 en células cromafines bovinas cargadas con la sonda Flúo-4.** En la parte superior de la figura se muestran registros representativos de fluorescencia inducidos por nicotina a 3  $\mu$ M (**A**) y 5IA85380 a 100 nM (**B**) medidos durante 10 s de estimulación continua de agonista solo o en células preincubadas y coincubadas durante 15 min con BGT 100 nM o mecamilamina 30  $\mu$ M. (**C**) Representa la media de los picos máximos de fluorescencia a concentraciones crecientes de nicotina (0,03-100  $\mu$ M) sola (cuadrados) o pre-incubadas durante 15 minutos con BGT (triángulos) o mecamilamina (círculos). (**D**) Representa el mismo protocolo usado para la fig. C cuando las células fueron estimuladas con el agonista nicotínico 5IA85380 (0,003-3  $\mu$ M). Cada punto representa la media  $\pm$  el s.e.m. de cinco experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al agonista solo se estimaron de la siguiente forma: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Al igual que la nicotina, las respuestas inducidas por el agonista 5IA85380 no se modificaron por BGT pero se bloquearon por completo con mecamilamina (Fig. 1B y D).

Las figuras 8 A y B muestran registros representativos de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por nicotina (3  $\mu\text{M}$ ) y 5IA85380 (100 nM) a concentraciones próximas a sus respectivas  $\text{EC}_{50}$ .

En conjunto, estos resultados indican que estos dos agonistas están estimulando receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha 7$ .

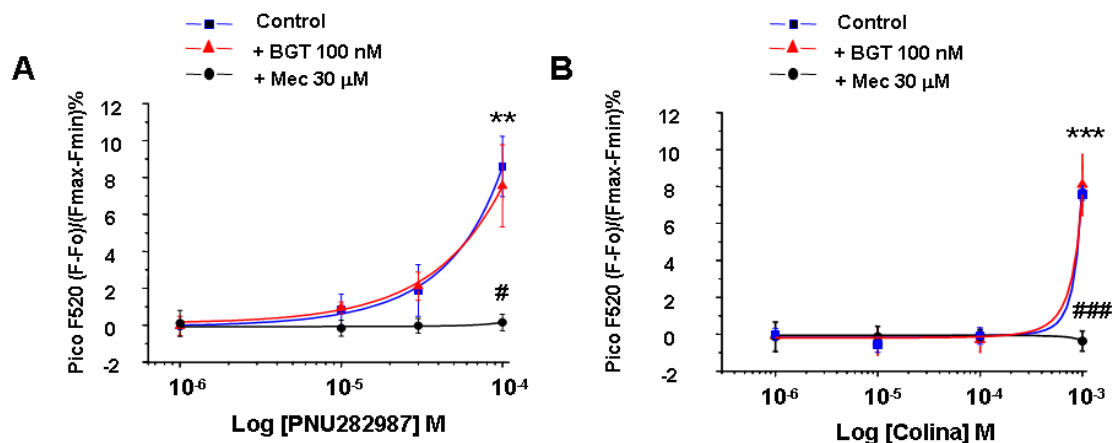
#### **V.1.2. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES MEDIADAS POR LOS AGONISTAS $\alpha 7$ SELECTIVOS, PNU282987 Y COLINA.**

Dado que los agonistas nicotínicos nicotina y 5IA85380, por sí solos, no parecían producir señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por activación de nAChR  $\alpha 7$  en este modelo, decidimos utilizar agonistas selectivos de este subtipo para poder estudiar sus características farmacológicas y funcionales.

En primer lugar se realizó una curva concentración-respuesta para el agonista PNU282987 (Fig. 9A). Este agonista, presenta una gran afinidad por el subtipo  $\alpha 7$  (Hajos *et al.*, 2005) e incluso produce un ligero bloqueo de la activación del subtipo  $\alpha 3\beta 4$  (ver Introducción Tabla I).

A concentraciones menores de 100  $\mu\text{M}$ , el PNU282987 no produjo señales de  $\text{Ca}^{2+}$  significativas; sin embargo, a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  sí que fue capaz de inducir una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que no se bloqueó por BGT pero sí por mecamilamina.

Dados los resultados obtenidos con PNU282987, decidimos utilizar otro agonista selectivo  $\alpha 7$ , la colina (Alkondon *et al.*, 1997). La colina por sí sola no produjo un aumento en la fluorescencia a concentraciones inferiores a 1 mM, sin embargo, a partir de esta concentración, comenzó a producir una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular medible, que se bloqueó por mecamilamina pero no por BGT (Fig. 9B). Por tanto, los resultados fueron similares a los obtenidos con el PNU282987 e indican que a altas concentraciones, los agonistas selectivos  $\alpha 7$  (PNU282987 y colina) se hacen inespecíficos actuando sobre receptores  $\alpha 7$ .



**Figura 9. Medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares inducidas por los agonistas selectivos  $\alpha 7$  PNU282987 y colina.** Las células se cargaron con la sonda Fluo-4 y después fueron estimuladas con concentraciones crecientes del agonista selectivo  $\alpha 7$  **(A)** PNU282987 (1-100  $\mu\text{M}$ ) o **(B)** colina (1-1000  $\mu\text{M}$ ). El antagonista mecamilamina (mec 30  $\mu\text{M}$ ) o BGT (100 nM) se pre-incubaron 15 min antes de la inyección de los agonistas. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de al menos 4 experimentos de cultivos diferentes por triplicado. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ : respecto de las restantes concentraciones de agonista; #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ : respecto del agonista a la misma concentración.

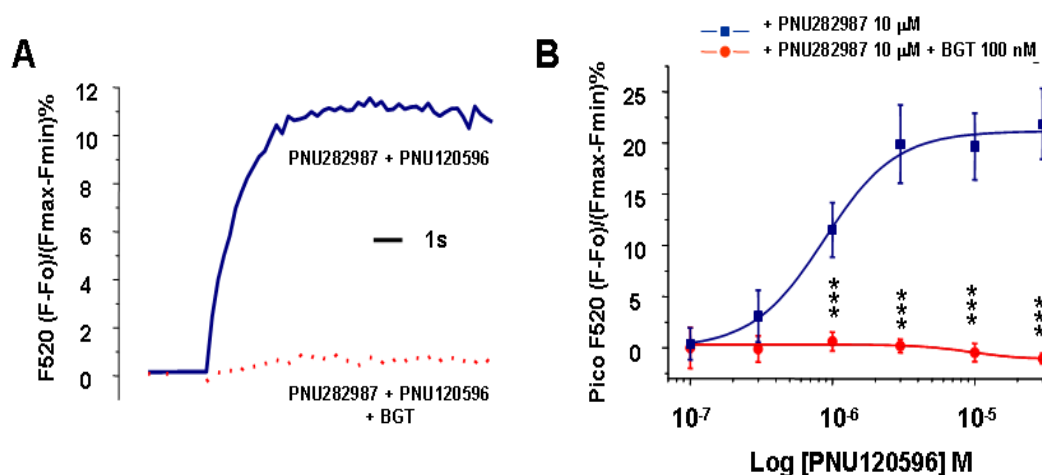
### V.1.3. EI MODULADOR ALOSTÉRICO SELECTIVO $\alpha 7$ POTENCIA LAS SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES MEDIADAS POR BAJAS CONCENTRACIONES DE PNU282987 Y COLINA: LA RESPUESTA $\alpha 7$

Puesto que los agonistas  $\alpha 7$  no producían “per se” una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a BGT, utilizamos el modulador alostérico positivo  $\alpha 7$ , e I PNU120596 (Hurst *et al.*, 2005), con el objeto de evaluar si éste podría potenciar las señales mediadas por los agonistas nicotínicos  $\alpha 7$ .

En la figura 10A se muestra un registro representativo de señales de fluorescencia medida en células estimuladas con una concentración de PNU282987 (10  $\mu\text{M}$ ) que no produjo efecto (Fig. 9 A). Obsérvese como la señal de fluorescencia se ve enormemente incrementada en presencia del modulador alostérico y, como dicha potenciación se bloquea por completo por BGT (Fig. 10 A). Tal como se demuestra en la figura 10B, el



modulador alostérico potenció de forma concentración dependiente la respuesta mediada por el agonista  $\alpha 7$  PNU282987 (10  $\mu$ M), con una  $EC_{50}$  de  $0,89 \pm 0,14 \mu$ M.

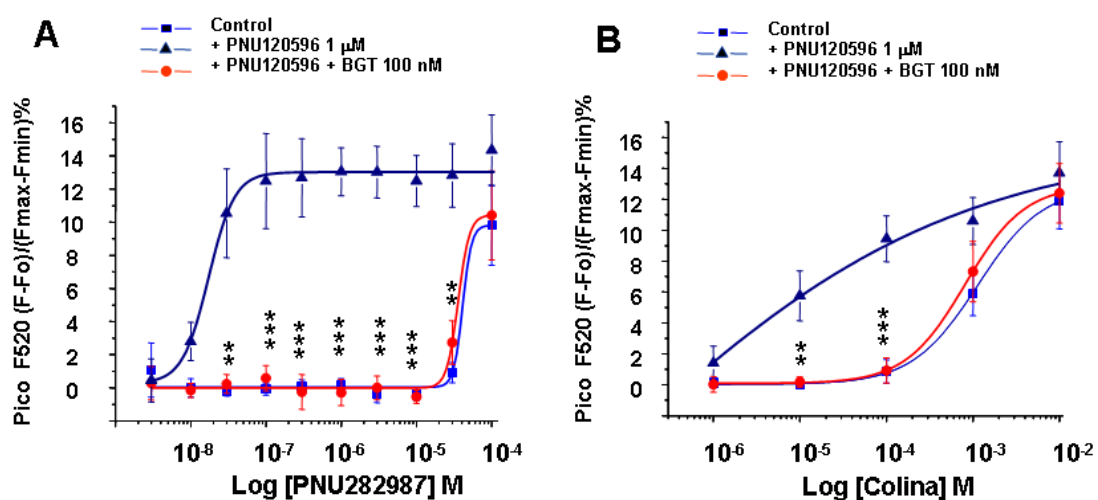


**Figura 10. El modulador alostérico selectivo PNU120596 potencia la señal de  $Ca^{2+}$  mediada por estimulación del nAChR  $\alpha 7$ .** (A) Muestra un registro representativo de PNU282987 a 10  $\mu$ M en células que fueron pre-tratadas durante 15 minutos con el modulador alostérico selectivo  $\alpha 7$  PNU120596 a 1  $\mu$ M. A esta concentración de agonista, que no induce señales de  $Ca^{2+}$  medibles (figura 2 A), el modulador fue capaz de incrementar el  $Ca^{2+}$  intracelular significativamente y esta potenciación de la señal se bloqueó por completo con BGT. (B) Muestra la curva concentración-respuesta de PNU120596 (0,1-30  $\mu$ M) a una concentración fija de PNU282987 10  $\mu$ M. Las células control fueron incubadas durante 15 minutos con el mismo porcentaje de DMSO que el aportado por la solución del PNU120596. La incubación con BGT bloqueó por completo la respuesta PNU282987+PNU120596 a todas las concentraciones usadas. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 experimentos de cultivos diferentes por triplicado. Diferencias significativas respecto de PNU282987+PNU120596: \*\*\*  $p < 0.001$ .

A continuación, realizamos curvas concentración-respuesta de los agonistas  $\alpha 7$  PNU282987 y colina en células pre-incubadas con una concentración fija del modulador alostérico PNU120596 a 1  $\mu$ M, concentración cercana a su  $EC_{50}$ . Como puede observarse en la figura 11 A, en células pre-tratadas con el modulador alostérico, la respuesta inducida por concentraciones inferiores a 100  $\mu$ M de PNU282987 fueron potenciadas de forma significativa, con máximos de 12 veces respecto a la señal del agonista solo. Dicha potenciación fue bloqueada por completo por BGT. Sin embargo, cuando el PNU282987

(100  $\mu\text{M}$ ) produjo una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  medible, la potenciación mediada por el modulador alostérico disminuyó y, esta menor potenciación se bloqueó con BGT hasta los niveles del agonista sólo, corroborando que la señal inducida por el PNU agonista sin modulador está mediada por nAChR no- $\alpha 7$ .

También realizamos experimentos similares con el agonista selectivo  $\alpha 7$  endógeno colina. Tal como se muestra en la figura 11 B, la colina mostró un comportamiento muy parecido al PNU282987. Así, a una concentración subefectiva (100  $\mu\text{M}$ ), que por sí sola no producía incrementos significativos de fluorescencia, en presencia del modulador alostérico ocasionó una gran potenciación de la señal; dicha potenciación se bloqueó completamente por BGT. Al incrementar la concentración de colina, la potenciación inducida por el modulador alostérico disminuyó en la misma proporción que el bloqueo por BGT.



**Figura 11. Señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por nAChR  $\alpha 7$ : dependencia de la concentración de agonista.** Curva concentración-respuesta de (A) PNU282987 (0,003-100  $\mu\text{M}$ ) y (B) colina (1  $\mu\text{M}$ -10 mM) en presencia y ausencia del modulador alostérico PNU 120595 ( $\mu\text{M}$ ). Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 cultivos diferentes de células por triplicado. Diferencias significativas respecto del agonista más el PNU120596: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

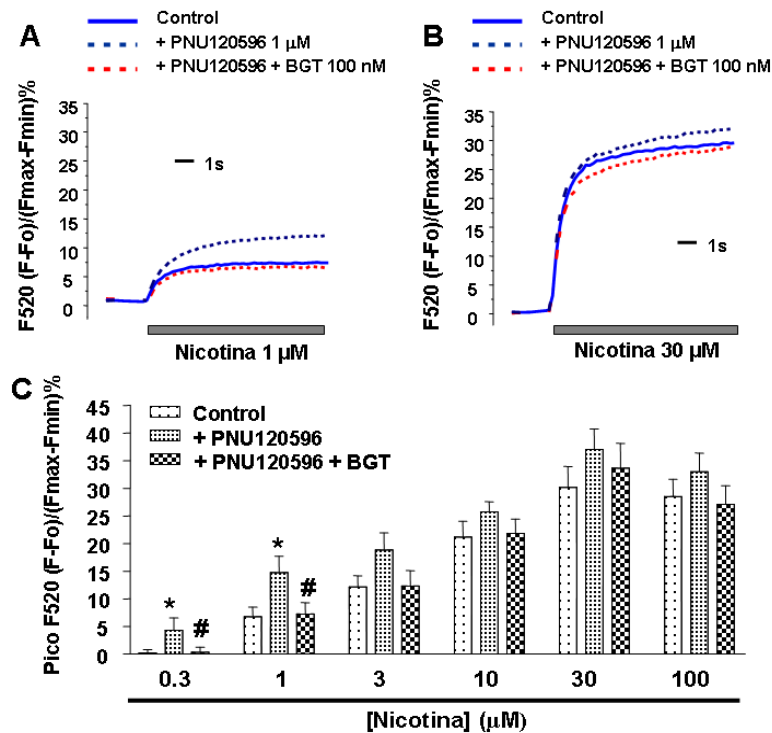
En conjunto, estos resultados indican que para observar señales significativas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares mediadas por nAChR del subtipo  $\alpha 7$  se requiere de la presencia de un modulador alostérico y bajas concentraciones de agonista.

#### **V.1.4. CONCENTRACIONES BAJAS DE NICOTINA EN PRESENCIA DEL MODULADOR ALOSTÉRICO $\alpha 7$ PNU120596 PRODUCEN SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ SENSIBLES A BGT.**

Dado que aquellas concentraciones de agonista  $\alpha 7$  que no producían señales de  $\text{Ca}^{2+}$  significativas fueron potenciadas en presencia del modulador alostérico, decidimos ver si las respuestas de nicotina podrían también potenciarse por el modulador.

La pre-incubación de las células con el modulador, potenció las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por concentraciones bajas (0,3 y 1  $\mu\text{M}$ ) del agonista nicotínico nicotina; dicha potenciación fue inhibida por BGT (Fig. 12 A y C). Sin embargo, a concentraciones mayores de 1  $\mu\text{M}$ , la potenciación modulada por el PNU120596, no fue estadísticamente significativa y, tampoco se bloqueó por BGT (Fig. 12 B y C).

Estos resultados sugieren que la nicotina puede ejercer un efecto dual. A bajas concentraciones y en presencia del modulador alostérico puede mediar señales de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de receptores nicotínicos  $\alpha 7$ . Y, a concentraciones mayores, la potenciación modulada por el PNU120596 comienza a disminuir y, la nicotina induciría incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, predominantemente, por la activación de nAChR del subtipo no- $\alpha 7$ .

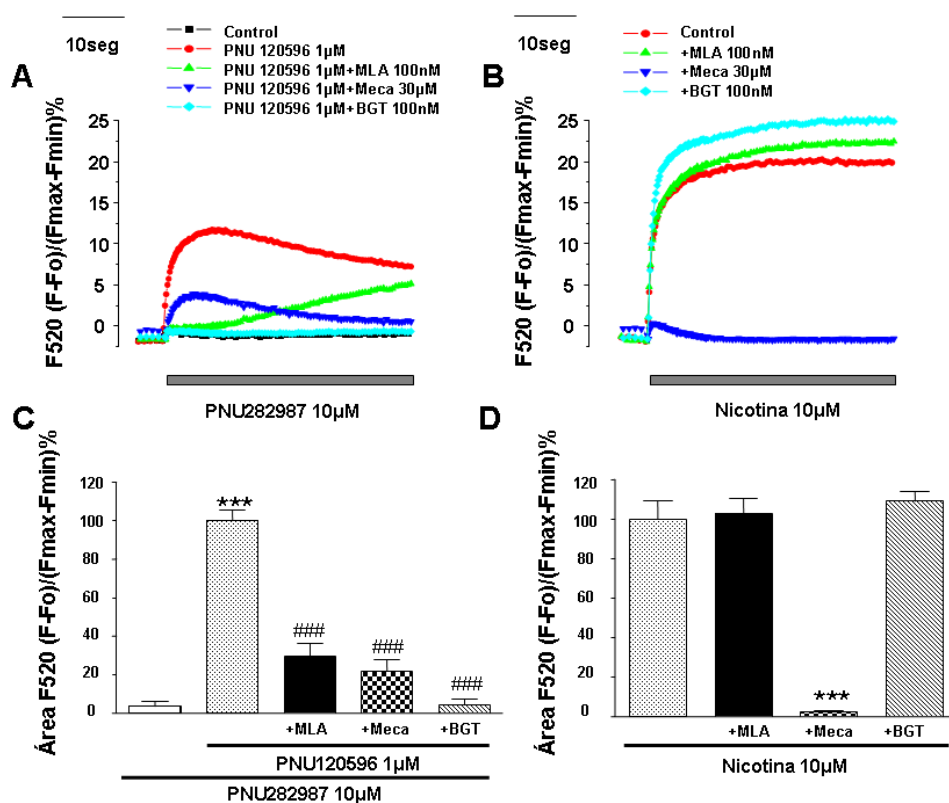


**Figura 12. Efecto dual de nicotina sobre nAChR  $\alpha$ 7 y no- $\alpha$ 7.** (A) Registros representativos de medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células estimuladas con una baja concentración de nicotina ( $1 \mu\text{M}$ ); esta respuesta fue potenciada por PNU120596 ( $1 \mu\text{M}$ ) y a su vez bloqueada completamente por BGT 100 nM: una respuesta  $\alpha$ 7. (B) Experimentos similares pero a una concentración mayor de nicotina ( $30 \mu\text{M}$ ). En este caso, la respuesta nicotínica no se modificó por PNU120596 o BGT: una respuesta no- $\alpha$ 7. (C) Curva concentración-respuesta de nicotina sola (control) o de células pre-incubadas con PNU120596 ( $1 \mu\text{M}$ ) o PNU120596 ( $1 \mu\text{M}$ ) más BGT (100nM). Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 5 a 10 cultivos celulares distintos por triplicado. \* $p < 0.05$ : respecto del control, # $p < 0.05$ : respecto de nicotina más PNU120596. ANOVA de una vía y test de Newman-Keuls.

#### V.1.5. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS BGT, MLA Y MECAMILAMINA SOBRE LAS SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ MEDIADAS POR nAChR $\alpha$ 7 Y NO- $\alpha$ 7.

Para ahondar más en el conocimiento de la participación de ambos subtipos de nAChR en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, analizamos parámetros como el área debajo de la curva en presencia de distintos antagonistas selectivos  $\alpha$ 7 y no- $\alpha$ 7 en células cargadas con la sonda Fluo-4. La figura 6 A y B muestra registros representativos del bloqueo por BGT, MLA y mecamilamina frente a la respuesta  $\alpha$ 7 (13 A) y no- $\alpha$ 7 (13 B),

respectivamente. El antagonista competitivo irreversible BGT, produjo un bloqueo total de la respuesta  $\alpha 7$  a lo largo de todo el tiempo de registro. Sin embargo, el bloqueo del antagonista competitivo reversible MLA fue total durante los 10 primeros segundos de la inyección del PNU282987, sin embargo a medida que aumentaba el tiempo disminuyó el bloqueo. Este efecto se ve reflejado en una menor reducción del área bajo la curva producido por MLA (70,43 $\pm$ 8,63 %) con respecto la ocasionada por BGT (95,57 $\pm$ 3,38 %) (Fig. 13 C). El bloqueo inducido por mecamilamina fue de 78,27 $\pm$ 14,11% en el caso de la respuesta  $\alpha 7$  y de 97,59 $\pm$ 10,77% en la no- $\alpha 7$  (Fig. 13 C y D).

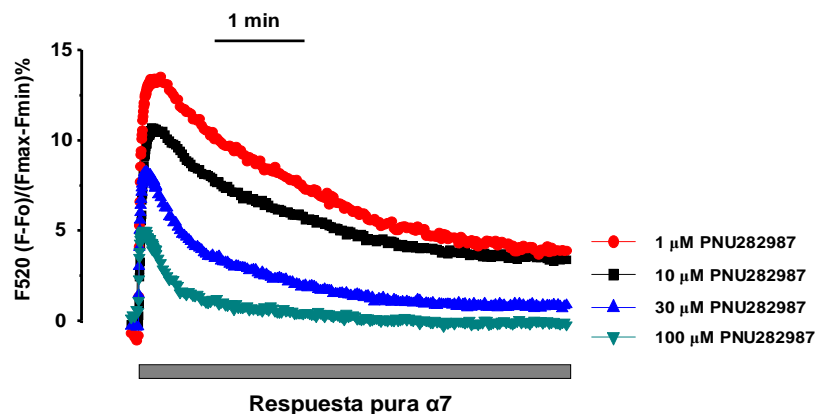


**Figura 13. Comportamiento de distintos antagonistas frente a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .** (A) Registro representativo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por PNU282987 10  $\mu\text{M}$  solo (control) o en presencia del PNU120596 1  $\mu\text{M}$ ; y éste en presencia de MLA 100 nM, BGT 100 nM o mecamilamina 30  $\mu\text{M}$ . (B) Registro representativo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por nicotina 10  $\mu\text{M}$  en presencia de los mismos antagonistas de figura (A). Las figuras C y D muestran la media del área debajo de la curva de los trazos de fluorescencia normalizados respecto a (C) PNU282987+PNU120596 y (D) nicotina. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 cultivos diferentes por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$ : respecto de PNU282987 (C) respecto de nicotina (D), ### $p < 0.001$ : respecto de PNU282987+PNU120596.

En el caso de la respuesta no- $\alpha 7$  y al igual que en experimentos mostrados anteriormente, tanto MLA como BGT no produjeron una modificación de la respuesta, sin embargo mecamilamina fue capaz de abolir, casi por completo, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por este subtipo de nAChR (Fig. 13 B y C).

#### **V.1.6. DESENSIBILIZACIÓN DE LA SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ MEDIADA POR nAChR $\alpha 7$ .**

Dado que el nAChR  $\alpha 7$  se caracteriza por su rápida desensibilización (Olale *et al.*, 1997) nos planteamos estudiar si este era el caso en nuestras condiciones experimentales. En este sentido, diseñamos experimentos para determinar si se producía una desensibilización dependiente de la concentración del agonista tal como se ha descrito previamente (Fatt, 1950; Katz & Thesleff, 1957). Para ello, medimos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, con la sonda Fluo-4, tras estimular las células con concentraciones crecientes de PNU282987 (1-100  $\mu\text{M}$ ) en presencia del modulador alostérico 1  $\mu\text{M}$  durante 5 minutos. Al aumentar la concentración del agonista, la señal  $\alpha 7$  disminuyó. Dado que en estas condiciones, algunas de las respuestas pueden ser una combinación de  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  (Fig. 11 A), para determinar las señales puramente  $\alpha 7$ , se restaron a los trazos de fluorescencia obtenidos por ambos PNU, los trazos obtenidos por estos en presencia de BGT (señal no- $\alpha 7$ ); esto se realizó con cada una de las concentraciones de agonista para cada cultivo. Al final, se obtuvieron registros del tipo que se muestra en la figura 14.



**Figura 14.** Trazos representativos de los incrementos de fluorescencia mediados por respuestas  $\alpha 7$  puras a concentraciones crecientes de PNU282987 más PNU120596. Para obtener la respuesta  $\alpha 7$  neta, se restaron las respuestas no- $\alpha 7$  (PNU282987 1-100 $\mu$ M+PNU120596 1 $\mu$ M+BGT 100nM) a las  $\alpha 7$  (PNU282987 1-100 $\mu$ M+ PNU120596 1 $\mu$ M).

Una vez restado a los trazos la respuesta no- $\alpha 7$ , se analizaron en estos registros el pico máximo, la  $\tau_{act}$  y la  $\tau_{inac}$ . El pico máximo de las señales de  $Ca^{2+}$  disminuyó a medida que aumentó la concentración de agonista y estos resultados se correlacionaron con la reducción de la  $\tau_{act}$  y la  $\tau_{inac}$  (ver Tabla IV).

**Tabla IV:** Representa las medias de las constantes de activación ( $\tau_{on}$ ), e inactivación ( $\tau_{off}$ ) y el valor de los picos máximos de los trazos de fluorescencia de la respuesta  $\alpha 7$  neta. Para la obtención de las señales  $\alpha 7$  puras se realizaron los áculos explicados en la figura 14. Una vez obtenidas estas curvas para 4 cultivos diferentes, se hallaron las  $\tau_{on}$ ,  $\tau_{off}$  y picos máximos.

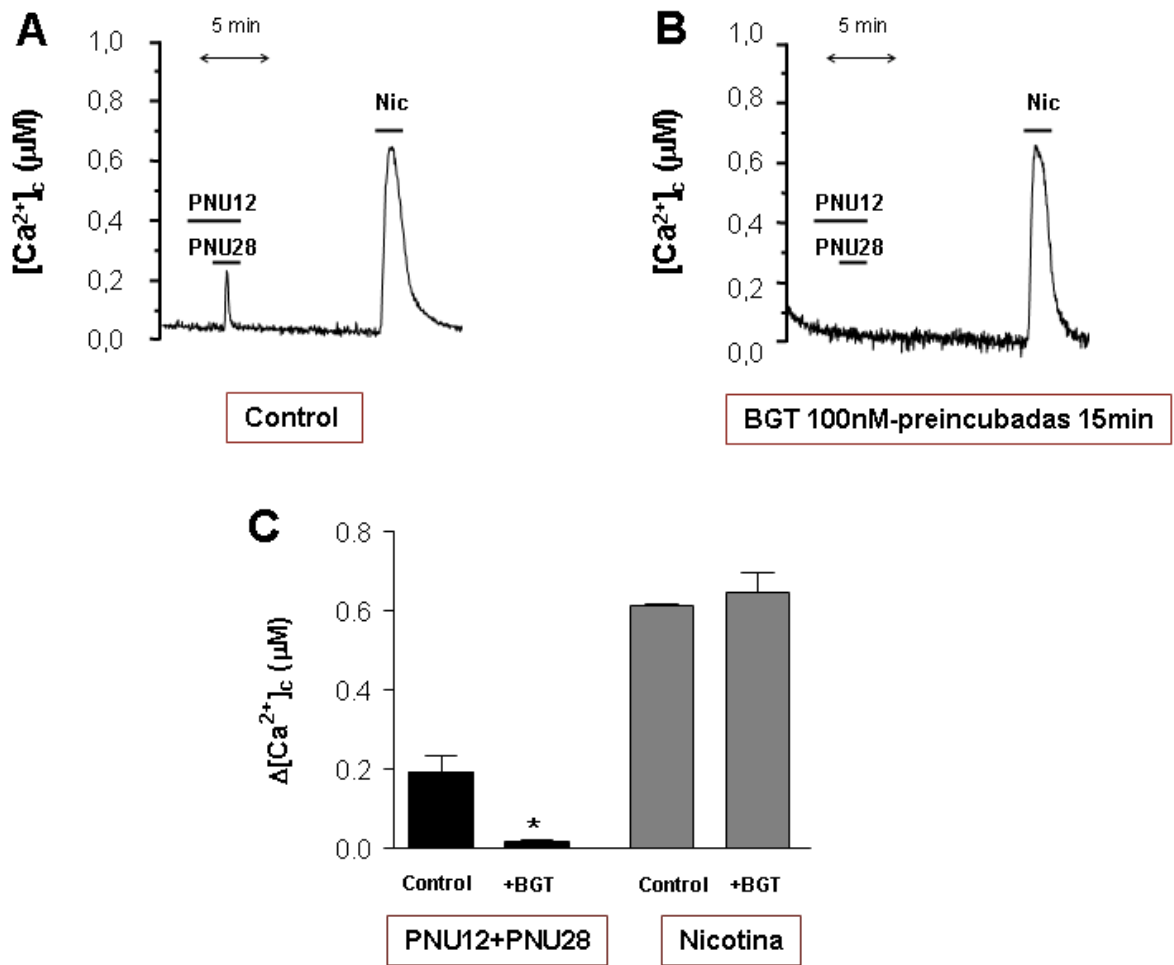
Concentración de agonista	$\tau_{act}$	$\tau_{inac}$	Pico <sub>max</sub>
1 $\mu$ M	7.51 $\pm$ 1.18	67.46 $\pm$ 16.22	16.49 $\pm$ 2.77
10 $\mu$ M	4.34 $\pm$ 0.24	64.32 $\pm$ 14.33	15.63 $\pm$ 2.73
30 $\mu$ M	4.00 $\pm$ 0.70	51.51 $\pm$ 13.53	12.46 $\pm$ 1.84
100 $\mu$ M	2.90 $\pm$ 0.68	22.16 $\pm$ 1.77	8.4 $\pm$ 2.68

Otro método para analizar la desensibilización de un receptor, se basa en el cálculo de la disminución de respuesta inducida por un segundo pulso en experimentos de pulsos consecutivos de agonista. Debido a que la técnica de medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en placas no permite este tipo de experimentos, recurrimos a la técnica de medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en poblaciones celulares que expresan aequorinas dirigidas al citosol. Este método permite la medida de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol tras estímulos consecutivos en poblaciones celulares y, la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la utilización de un algoritmo (ver materiales y métodos).

Empleando este sistema de perfusión y registro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, expusimos las células cromafines a pulsos intercalados de concentraciones supramáximas de PNU282987 (10 $\mu\text{M}$ ) + PNU120596 (10 $\mu\text{M}$ ) y nicotina 30 $\mu\text{M}$ , es decir, respuestas mediadas por nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ , respectivamente (Fig. 15 A). Los incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inducidos por activación de nAChR  $\alpha 7$  ofrecieron picos máximos  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  entorno a los 200 nM, y tras la activación de los nAChR no- $\alpha 7$  de 600 nM (15 C). Sin embargo, cuando analizamos la entrada total de  $\text{Ca}^{2+}$ , integrando el área bajo la curva de los picos de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , pudimos determinar que la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  alcanzada tras la activación de los receptores  $\alpha 7$  era muy pequeña, es decir, un 14% respecto la respuesta no- $\alpha 7$ .

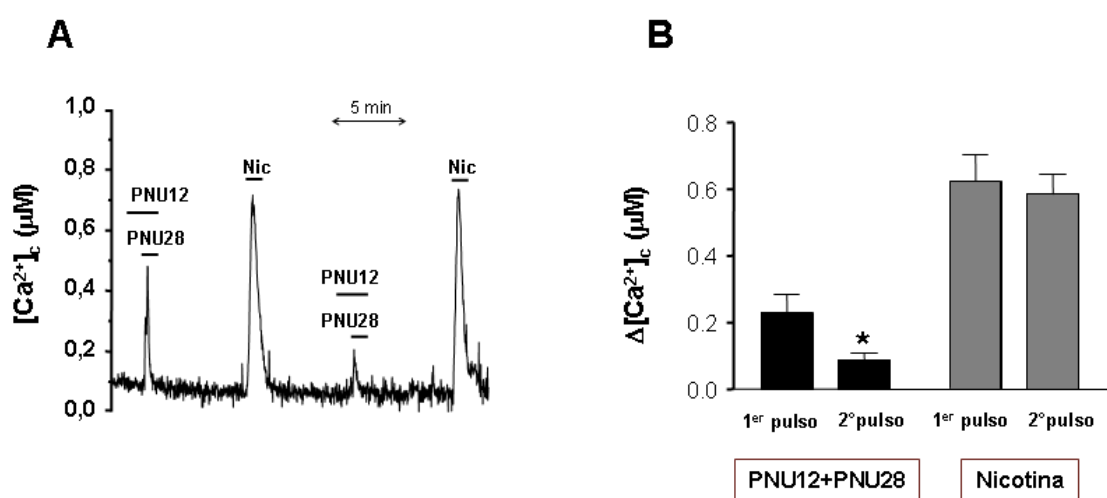
Cuando se pre-incubaron las células con 100 nM de BGT, 15 minutos antes de comenzar el registro, se observó un bloqueo total de la respuesta inducida por ambos PNU pero no la ocasionada por nicotina (Fig. 15 B y C). Por tanto, estos resultados concordaban con los obtenidos previamente en células cargadas con Fluo-4 y registrados mediante un lector de fluorescencia en placas.





**Figura 15. Magnitud de señales de  $[Ca^{2+}]_i$  mediados por activación de nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  registrados mediante la técnica de aequorinas.** Las células cromafines que expresaban aequorinas citosólicas fueron reconstituídas con celenterazina y posteriormente se midió la luminiscencia bajo una perfusión continua de solución Krebs-HEPES 2 mM de  $Ca^{2+}$ . La figura **(A)** muestra registros representativos de los trazos de luminiscencia obtenidos tras la estimulación de concentraciones supramáximas de PNU282987 10  $\mu M$  + PNU120596 10  $\mu M$  o nicotina 30  $\mu M$ . **(B)** Ilustra un experimento similar al de la figura **(A)** pero en células pre-incubadas 15 minutos antes del experimento con BGT 100 nM. **(C)** Representa la estadística de al menos 3 experimentos de diferentes cultivos como los mostrados en la figura A y B, las barras corresponden a las medias  $\pm$  s.e.m. de los picos máximos. Las diferencias significativas se determinaron en ambos casos por el test de la t Student no pareado (\* $p < 0.05$ : respecto del control).

Para analizar la desensibilización de las respuestas mediadas por los nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ , realizamos experimentos de aplicación de pulsos consecutivos. La figura 16 A muestra un registro representativo en el que se aplican dos pulsos consecutivos con los dos PNU y nicotina, de forma alternante. Como puede observarse, el incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  en un segundo pulso tras estimulación del subtipo  $\alpha 7$  se redujo de forma significativa respecto al primer pulso. Al contrario que en el caso de la respuesta  $\alpha 7$ , el incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  inducida por un segundo pulso de nicotina, no produjo una disminución significativa de la señal de  $Ca^{2+}$  en comparación con el primer pulso. La disminución de las señales de  $Ca^{2+}$  en un segundo pulso mediante la aplicación de los PNU sugiere que el subtipo  $\alpha 7$  se desensibiliza más rápidamente que un período más prolongado que el subtipo no- $\alpha 7$  (Fig. 16).



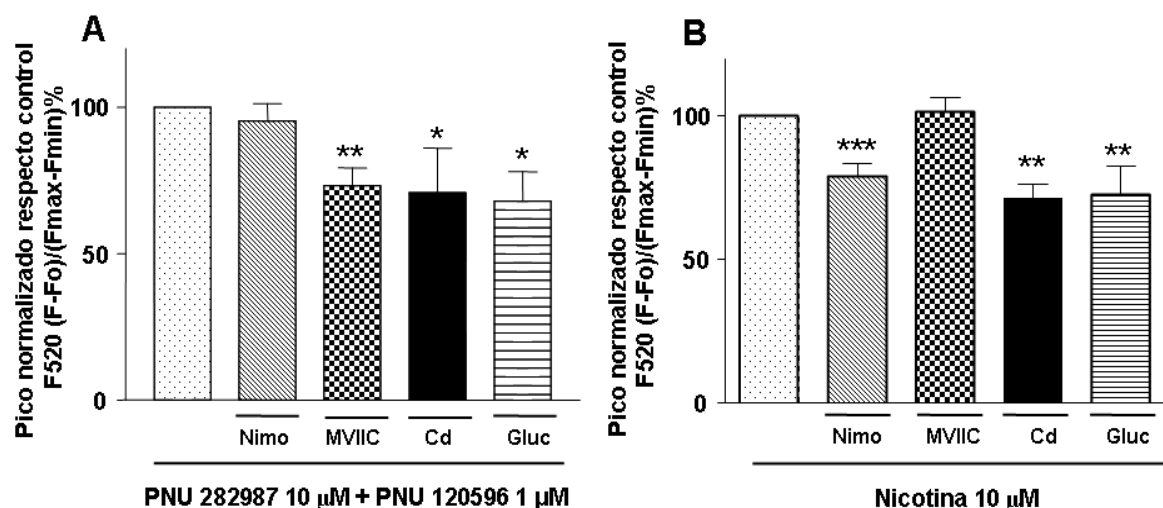
**Figura 16. Inactivación de las señales de  $Ca^{2+}$  mediadas por la activación del subtipo  $\alpha 7$  y no-  $\alpha 7$  medidas con aequorinas. (A)** Muestra un registro representativo de señales de  $Ca^{2+}$  por pulsos consecutivos y alternos a concentraciones supramáximas de PNU282987 (10 μM) + PNU120596 (10 μM) o nicotina 30 μM. La figura **(B)** representa la media  $\pm$  s.e.m. de los picos máximos inducidos en experimentos del tipo mostrado en figura **(A)**. La estadística es de al menos 4 experimentos de diferentes cultivos. Las diferencias significativas se determinaron en ambos casos por el test de la t Student no pareado (\* $p < 0.05$ : respecto del primer pulso).

**V.1.7. CONTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE CCDV A LOS INCREMENTOS DE  $\text{Ca}^{2+}$  CITOSÓLICO MEDIADOS POR nAChR  $\alpha 7$  Y NO-  $\alpha 7$ .**

Con el objetivo de explorar la contribución de los diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) a los incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  mediados por la activación de los subtipos  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ , las células se pre-incubaron con bloqueantes de los canales L (nimodipino, 3  $\mu\text{M}$ ) y no-L ( $\omega$ -conotoxina MVIIC, 2  $\mu\text{M}$ ). Como se ilustra en la figura 17 A, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por nAChR  $\alpha 7$  no se bloquearon por nimodipino; sin embargo, la  $\omega$ -conotoxina MVIIC bloqueó la respuesta en un  $19,70 \pm 6,98 \%$  respecto del control. Por el contrario, la respuesta no- $\alpha 7$  inducida por nicotina disminuyó en presencia de nimodipino en un  $16,91 \pm 7,66\%$  y no se vio afectada por  $\omega$ -conotoxina MVIIC (Fig. 17 B).

Para corroborar que los CCDV estaban implicados en los incrementos  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  mediados por la estimulación de los diferentes subtipos de nAChR, realizamos las siguientes manipulaciones experimentales: (i) utilizamos un bloqueante inespecífico de CCDV como el cadmio y (ii) empleamos la sustitución del sodio ( $\text{Na}^+$ ) extracelular por N-metil-glucamina evitando así, la despolarización dependiente de  $\text{Na}^+$  (bloqueo de activación de canales de sodio y bloqueo de la entrada de  $\text{Na}^+$  a través del propio receptor) y la consiguiente activación de CCDV.

Tanto el cadmio como la sustitución del  $\text{Na}^+$  extracelular disminuyeron las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la estimulación del subtipo  $\alpha 7$  y no  $\alpha 7$ . Este bloqueo no fue estadísticamente diferente al obtenido por  $\omega$ -conotoxina MVIIC en el caso de la estimulación del subtipo  $\alpha 7$  o por nimodipino en el caso de la estimulación no- $\alpha 7$  (Fig. 17 A y B).

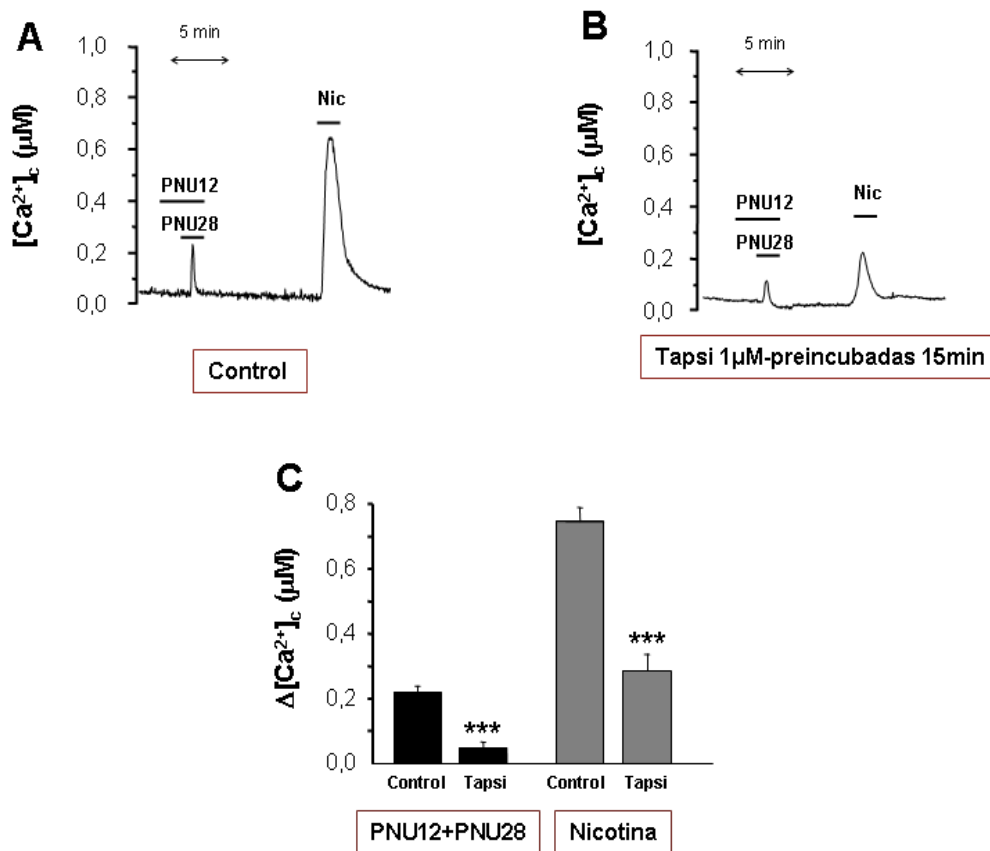


**Figura 17. Efecto de los bloqueantes de los CCDV en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por los nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .** La células fueron estimuladas con PNU282987 10  $\mu\text{M}$ + PNU120596 1  $\mu\text{M}$  (A), 10  $\mu\text{M}$  de nicotina (B), en presencia de 50  $\mu\text{M}$  cadmio (Cd), en solución control con N-metil glucamina (Gluc) en sustitución de  $\text{Na}^+$  o en presencia del nimodipino 3  $\mu\text{M}$  (bloqueante de CCDV de tipo L), u  $\omega$ -conotoxina MVIIC 2  $\mu\text{M}$  (bloqueante de CCDV de tipo no L). Las células control fueron suplementadas con el mismo porcentaje de DMSO (0,1 %) que el usado para disolver el nimodipino. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de al menos cuatro experimentos de cultivos diferentes por triplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ : diferentes respecto del control. Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de una vía y un test Newman-Keuls.

#### V.1.8. CONTRIBUCIÓN DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO AL INCREMENTO DE LA $[\text{Ca}^{2+}]_c$ INDUCIDA TRAS LA ESTIMULACIÓN DE LOS nAChR $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ .

Para estudiar la participación del RE en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares mediadas por receptores  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  hemos empleado la tapsigargina. La tapsigargina es un inhibidor de la SERCA que impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al RE, además de producir una depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  del mismo. De esta forma se impide la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE inducida por aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En células cromafines pre-incubadas con tapsigargina 1  $\mu\text{M}$ , 15 minutos antes de comenzar las medidas, observamos una reducción significativa, superior al 50 %, de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inducida por PNU282987 (10  $\mu\text{M}$ ) + PNU120596 (10  $\mu\text{M}$ ) y nicotina 30  $\mu\text{M}$  (Fig. 18 C). Por tanto, el  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del RE

también participa en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares mediadas tras la activación de nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .



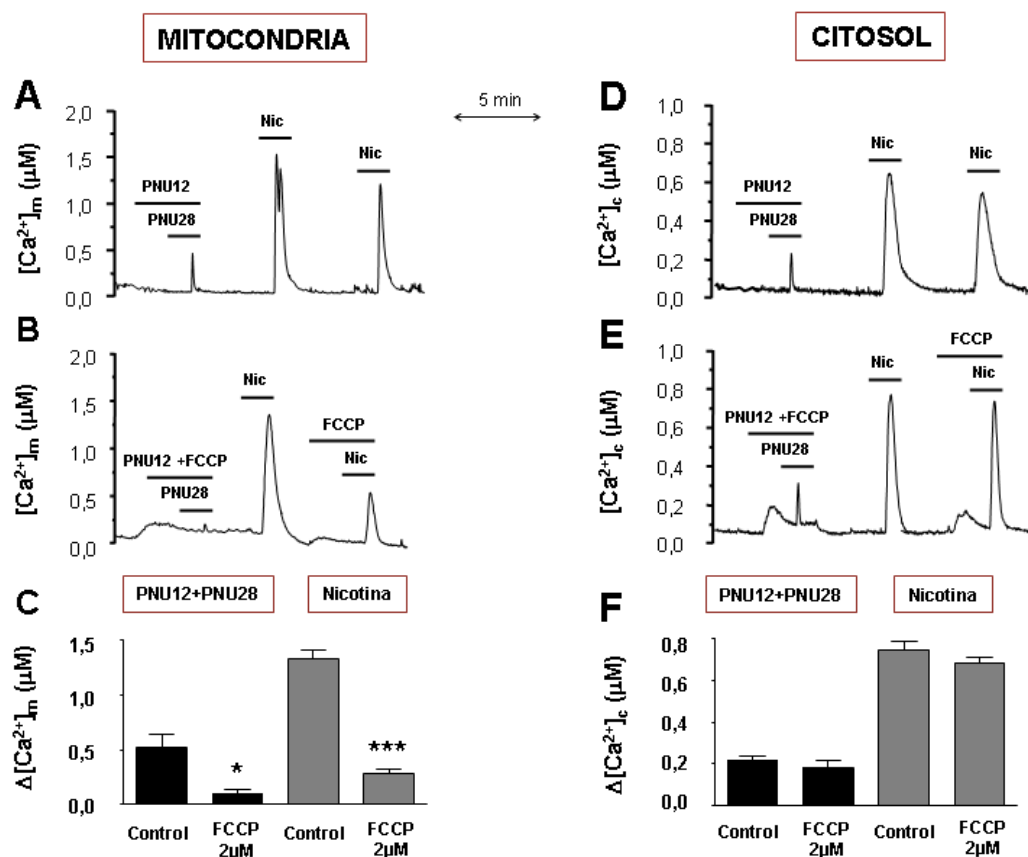
**Figura 18. Contribución del RE a los aumentos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediados por estimulación del  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .** Trazos representativos de señales de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidas por  $\alpha 7$  (PNU282987 10  $\mu\text{M}$ +PNU120596 10  $\mu\text{M}$ ) y no- $\alpha 7$  (nicotina 30  $\mu\text{M}$ ) nAChR (A) y en células pre-incubadas durante 15 minutos con 1  $\mu\text{M}$  de tapsigargina (B). (C) Estadística de los picos máximos inducidos en experimentos del tipo que se muestran en la figura (A) y (B). Los datos corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. de al menos 6 experimentos independientes de cultivos diferentes. \*\*\* $p < 0.001$  respecto del control aplicando un t Student no pareado.

#### V.1.9. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LOS TRANSITORIOS DE $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Estudios realizados con aequorinas dirigidas a la mitocondria demuestran que la mitocondria se comporta como un reservorio transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo estímulos como la ACh, el  $\text{K}^+$  o la cafeína (Montero *et al.*, 2000).

En nuestras condiciones experimentales, la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (antes de cualquier estimulación) fue similar en el citosol y la mitocondria, en torno a 0,1-0,2  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se corresponden con las obtenidas en células en reposo. Como se muestra en la figura 19 A y C, la mitocondria amplifica las  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . La estimulación de los nAChR  $\alpha 7$  mediante la combinación de PNU282987+PNU120596 causó un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  de  $516,36 \pm 118,97$  nM mientras que en el citosol fue de  $218,33 \pm 20,05$  nM (relación  $[\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_c$  fue de  $2,4 \pm 0,8$ ). Tras la estimulación de los nAChR no- $\alpha 7$  con nicotina, se alcanzó una  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  de  $1323,53 \pm 82,93$  nM y una  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de  $745,16 \pm 43,52$  nM (relación  $[\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_c$   $1,8 \pm 0,2$ ). Estas relaciones no son diferentes entre sí, lo que indica que la mitocondria capta de la misma forma el  $\text{Ca}^{2+}$  independientemente de si procede tras la estimulación del nAChR del subtipo  $\alpha 7$  o no- $\alpha 7$ .

En otra serie de experimentos bloqueamos la mitocondria con FCCP y medimos la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la mitocondria y en el citosol tras estimular los nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ . El FCCP es una sustancia desacoplante que disipa el gradiente de protones de la cadena respiratoria mitocondrial de forma reversible; es capaz de atravesar membranas lipofílicas y actúa como un transportador de protones del citosol al interior mitocondrial produciendo un colapso del potencial de membrana mitocondrial y, como consecuencia, impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior mitocondrial. Como se muestra en la figura 19 B y E, la perfusión de FCCP 2  $\mu\text{M}$  “per se” produjo un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el citosol como en la mitocondria de la misma magnitud, (aproximadamente  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}$  de 0,1-0,2  $\mu\text{M}$  ) que disminuyó hasta llegar a una meseta por encima de la basal). Cuando las células se estimularon con PNU282987 + PNU120596 o nicotina en células cuyas mitocondrias estaban bloqueadas con FCCP, observamos que el pico de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Fig.19 E y F) no se modificó pero el de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  se redujo, como era de esperar (Fig. 19 B y C ).

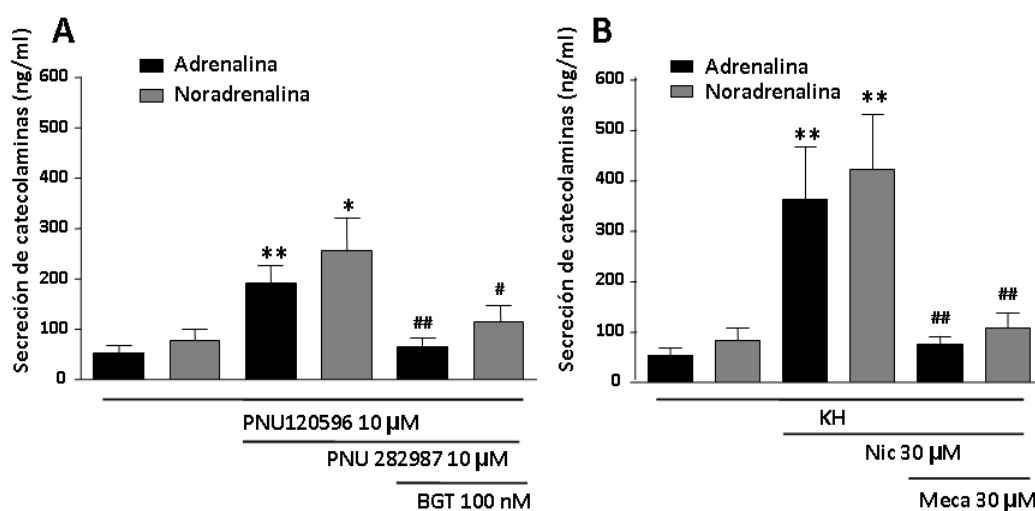


**Figura 19. Participación de la mitocondria en las señales de  $Ca^{2+}$  mediadas por nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .** Los paneles (A) y (D) muestran los efectos de la perfusión de PNU282987 10  $\mu M$  + PNU120596 10  $\mu M$  o 30  $\mu M$  de nicotina según se indica con aequorinas dirigidas al citosol o a la mitocondria, respectivamente. Los paneles (B) y (E) muestran los efectos de la pre-incubación (5 minutos) y co-incubación del FCCP 2  $\mu M$  en la estimulación del subtipo  $\alpha 7$  y no- $\alpha$ . Las figuras (C) y (F) representan la media  $\pm$  s.e.m. de 4 experimentos independientes de cultivos diferentes. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto del control usando un t Student no pareado.

#### V.1.10. LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN DE LOS nAChR DEL SUBTIPO $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ .

La secreción diferencial de adrenalina y noradrenalina inducida por la estimulación de ambos subtipos de nAChR se midió por HPLC. La secreción basal de adrenalina procedente de 500.000 células cromafines bovinas fue de  $53,93 \pm 15,40$  ng/ml, mientras que la de noradrenalina fue de  $83,66 \pm 24,88$  ng/ml. El modulador alostérico PNU120596 a la concentración de 10  $\mu M$  no modificó ni la secreción basal de adrenalina ( $53,23 \pm 15,13$

ng/ml) ni la de noradrenalina ( $76,54 \pm 25,89$ ). Sin embargo, en presencia del agonista  $\alpha 7$  PNU282987, la secreción de adrenalina aumentó a  $191,09 \pm 37,54$  ng/ml (359% de incremento) y de noradrenalina a  $254,81 \pm 71,78$  ng/ml (333% de incremento); estos aumentos de la secreción se bloquearon por completo por el antagonista selectivo  $\alpha 7$  BGT (Fig. 20 A). La respuesta no- $\alpha 7$  inducida por nicotina  $30 \mu\text{M}$  produjo una secreción de adrenalina de  $364,22 \pm 110,81$  ng/ml (675% de incremento) y de noradrenalina de  $422,34 \pm 116,32$  ng/ml (505% de incremento); dicha secreción se bloqueó por mecamilamina (Fig. 20 B). La secreción de catecolaminas en relación a la entrada máxima de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (datos de aequorinas) fue de 1,6 y 1,5 % de adrenalina y noradrenalina respectivamente para el subtipo  $\alpha 7$  y de 0,9 y 0,7 % de adrenalina y noradrenalina para el no- $\alpha 7$ .



**Figura 20. Liberación diferencial de adrenalina y noradrenalina inducida por estimulación de nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .** Las células se incubaron durante 30 s con ambos PNU o nicotina y el medio se recogió para medir la secreción de catecolaminas por HPLC. Los antagonistas y el modulador se pre-incubaron 5 minutos antes y durante la aplicación de los agonistas. Las barras muestran la media  $\pm$  s.e.m. de 7 experimentos independientes de cultivos diferentes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : estadísticamente diferente respecto del PNU120596 solo en el panel (A) o de solución control en el panel (B). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ : estadísticamente diferente de ambos PNU (A) y de nicotina (B). El análisis estadístico fue un ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls



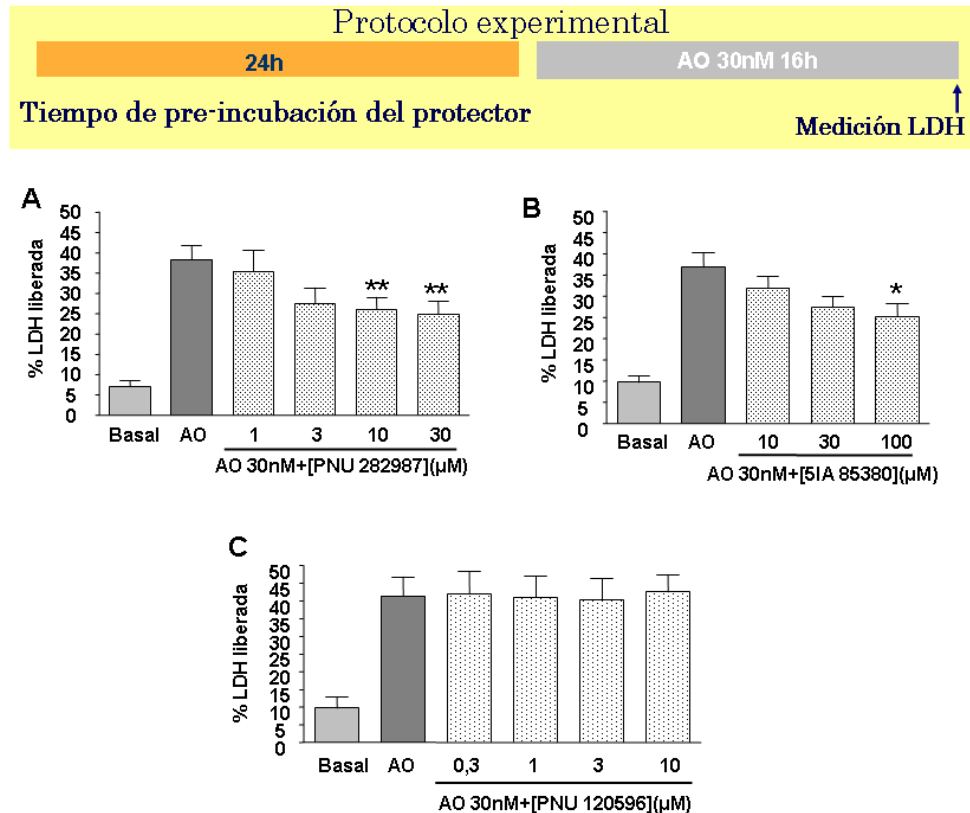
## **V.2. MECANISMOS NEUROPROTECTORES MEDIADOS TRAS LA ACTIVACIÓN DE nAChR $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ EN UN MODELO DE HIPERFOSFORILACIÓN DE $\tau$ .**

Existen múltiples estudios que muestran que diversos agonistas nicotínicos son capaces de neuroproteger frente a estímulos tóxicos que están relacionados con la patología de la EA (ver introducción). El AO es una toxina producida por un alga marina que inhibe proteína-fosfatasa con una potencia inhibitoria PP2A>PP1>PP2B; esto provoca una hiperfosforilación de la proteína  $\tau$  tanto en modelos *in vivo* (Tian *et al.*, 2004) como *in vitro* (Uberti *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998). Además, la actividad de la fosfatasa PP2A se encuentra disminuída en cerebros de EA (Iqbal & Grundke-Iqbal, 2008). Por todo esto, el AO es aceptado como un modelo que reproduce la muerte celular y la hiperfosforilación de  $\tau$  característica de esta enfermedad (Tanaka *et al.*, 1998).

Por otra parte, hemos empleado como modelo celular la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y ya que en esta línea celular se ha demostrado que el AO es capaz de hiperfosforilar  $\tau$  y causar muerte celular (Perez *et al.*, 2002). A continuación se describen los resultados obtenidos.

### **V.2.1. EFECTO NEUROPROTECTOR DE DIVERSOS AGONISTAS NICOTÍNICOS Y EL MODULADOR ALOSTÉRICO $\alpha 7$ PNU120596 FRENTE A LA LESIÓN INDUCIDA POR ÁCIDO OKADAICO.**

Para determinar qué subtipos de nAChR podrían estar implicados en el efecto neuroprotector frente a AO utilizamos el agonista selectivo  $\alpha 7$  PNU282987 y el agonista selectivo del subtipo  $\beta 2^*$  5IA85380, así como el modulador alostérico  $\alpha 7$  PNU120596.



**Figura 21. Efecto protector mediado por los agonistas nicotínicos PNU282987, 5IA85380 y el modulador alostérico selectivo  $\alpha 7$  PNU120596 frente a la lesión inducida por 30 nM de AO.** El agonista selectivo  $\alpha 7$  PNU282987 **(A)** y el agonista selectivo  $\beta 2^*$  5IA85380 **(B)** ofrecieron protección frente a la toxicidad inducida por AO (30 nM) 16 h en células SH-SY5Y. Las células se pre-trataron durante 24h a concentraciones crecientes de PNU282987 (1-30  $\mu$ M) **(A)** y de 5IA85380 (10-100  $\mu$ M) **(B)**. El modulador alostérico selectivo  $\alpha 7$  PNU120596 no ofreció efectos protectores en un rango de concentraciones de 0,3-10  $\mu$ M **(C)**. Los datos muestran la media  $\pm$  s.e.m. de triplicados de al menos 4 cultivos diferentes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecto del AO solo. Análisis de ANOVA de una vía con el test de Newman-Keuls.

El tratamiento de las células SH-SY5Y con una concentración de 30nM de AO durante 16 h incrementó la muerte basal de un 7-10% a un 36-42%. Cuando pre-incubamos 24 h antes de añadir el AO las células con concentraciones crecientes del agonista nAChR  $\alpha 7$ , PNU282987, y transcurrido dicho tiempo, añadimos durante 16 h el tóxico (vea protocolo en la parte superior de la Fig. 21), observamos una reducción gradual de la muerte celular valorada como liberación de LDH al medio extracelular. El agonista  $\alpha 7$  consiguió ofrecer una protección significativa frente la lesión inducida por AO

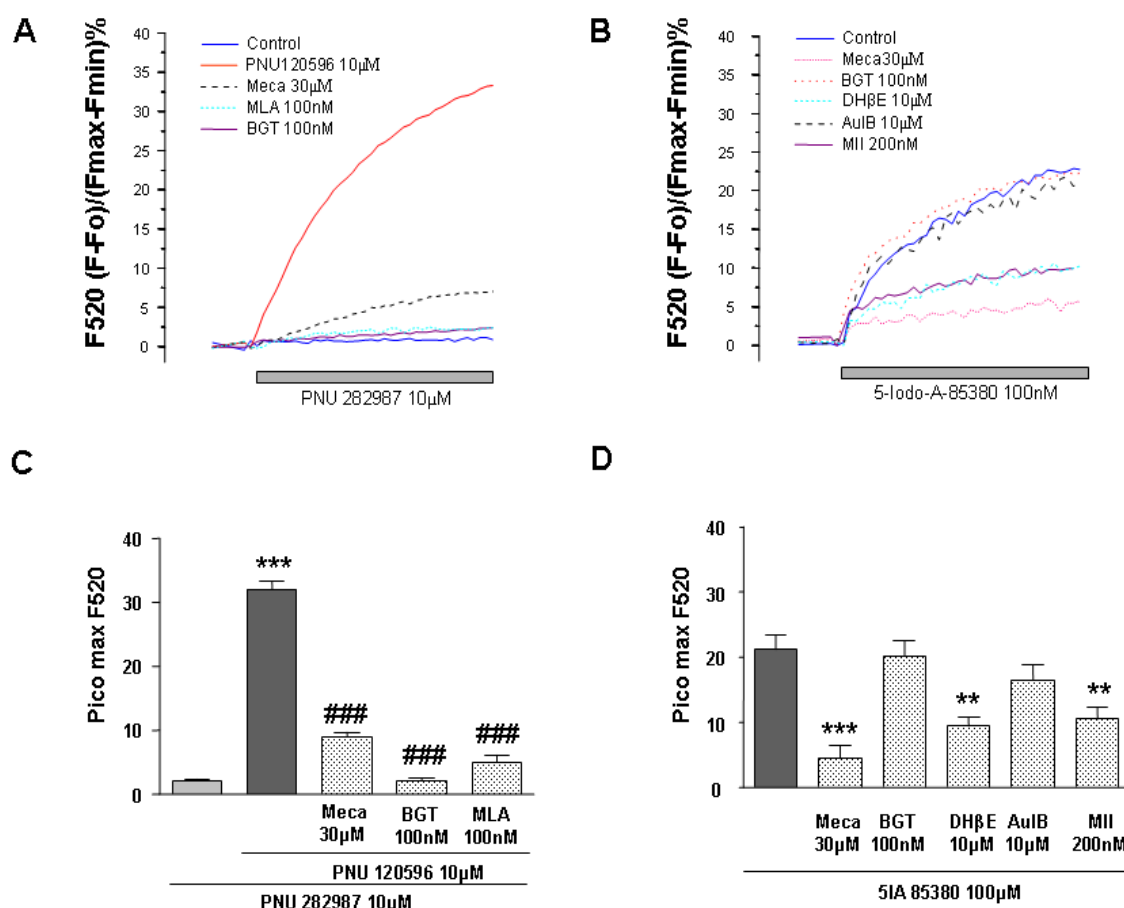
a las concentraciones de 10 y 30  $\mu\text{M}$  (Fig. 21 A). Cuando empleamos el agonista  $\beta 2^*$ , 5IA85380, sólo obtuvimos una protección significativa a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 21 B). Curiosamente el modulador alostérico  $\alpha 7$ , PNU120596, no mostró protección a ninguna de las concentraciones evaluadas (0,3 a 10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 21 C).

#### **V.2.2. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES INDUCIDAS POR PNU282987 Y 5IA85380.**

Como se mencionó en la introducción, las células SH-SY5Y presentan subunidades nicotínicas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  (Peng *et al.*, 1994; Gentry & Lukas, 2002), las cuales pueden agruparse y formar distintos subtipos de receptores nicotínicos. Con el objeto de determinar el efecto de los agonistas nicotínicos PNU282987 y 5IA85380 sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y su selectividad sobre los diferentes subtipos de nAChR, medimos señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en células SH-SY5Y cargadas con la sonda Flúo-4. Para este estudio, hemos empleado las concentraciones de agonista que mostraron un efecto neuroprotector en los experimentos del apartado anterior, con la idea de recabar información sobre el posible mecanismo de acción de ambos agonistas nicotínicos.

La figura 22 A muestra un registro representativo de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por el PNU282987 10  $\mu\text{M}$  solo o en presencia del modulador alostérico  $\alpha 7$  PNU120596 10 $\mu\text{M}$ ; también se muestran el efecto de distintos antagonistas de los distintos subtipos de nAChR. Se seleccionó la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de PNU120596 porque estudios anteriores han mostrado que es una concentración supra-máxima en cuanto a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el subtipo  $\alpha 7$  (Dickinson *et al.*, 2007). El PNU282987 por sí solo, no produjo una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  medible a esta concentración. Sin embargo, cuando el agonista se inyectó en células pre y co-incubadas con el modulador alostérico  $\alpha 7$  PNU120596, se observó un incremento significativo en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. Estos incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  estaban mediados por activación de nAChR ya que dicha señal se bloqueó significativamente por mecamilamina. En concreto, estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  son

atribuibles a estimulación de un nAChR del subtipo  $\alpha 7$ , ya que antagonistas selectivos nAChR  $\alpha 7$  como BGT y MLA bloquearon dicha entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 22 C).

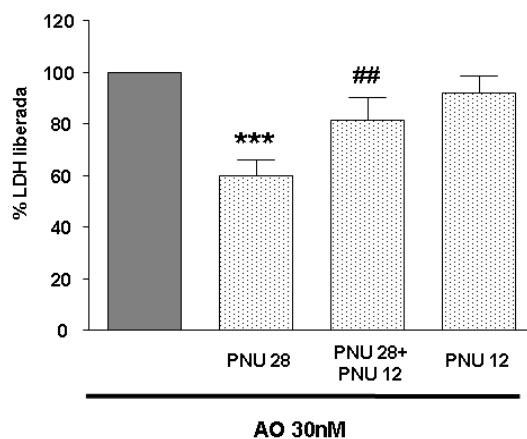


**Figura 22. Señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares mediadas por los agonistas PNU282987 y 5IA85380.** La figura (A) representa un registro representativo de células SH-SY5Y estimuladas con PNU282987 10 µM sólo o después de pre-incubarse durante 15 minutos con el modulador selectivo  $\alpha 7$  PNU120596 10 µM. El PNU120596 también se co-incubó con diversos antagonistas nicotínicos como mecamilamina (“Meca” 30 µM),  $\alpha$ -bungarotoxina (“BGT” 100 nM) o metilicacónitina (“MLA” 100 nM). (B) Ilustra otro registro representativo de la señal inducida por 5IA85380 100 µM o de éste en presencia de los antagonistas nicotínicos Meca 30 µM, BGT 100 nM,  $\alpha$ -conotoxina-AulB (“AulB” 10 µM), dihidro $\beta$ eritroidina (“DH $\beta$ E” 10 µM) o  $\alpha$ -conotoxina-MII (“MII” 200 nM). Las figuras (C) y (D) muestran las medias  $\pm$  s.e.m. de los aumentos máximos de fluorescencia a los 10 segundos de la aplicación del agonista PNU282987 (C) y 5IA85380 (D). Se realizaron experimentos por triplicado de al menos 6 cultivos diferentes. \*\*\* $p < 0.001$  respecto del PNU282987 solo (C) o respecto del 5IA85380 (D); ### $p < 0.001$  respecto del PNU282987+PNU120596; \*\* $p < 0.01$  respecto del 5IA85380 (D).

El agonista nicotínico 5IA85380, a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , fue capaz de producir señales significativas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares por sí solo (Fig. 22 B y D); los antagonistas selectivos  $\beta 2^*$  como DH $\beta$ E y  $\alpha$ -conotoxina MII, además de la mecamilamina fueron capaces de bloquear significativamente las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por 5IA85380. Sin embargo, antagonistas  $\alpha 3\beta 4$  ( $\alpha$ -conotoxina AulB) o  $\alpha 7$  (BGT) no produjeron una modificación en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por este agonista. Estos datos indican que el agonista PNU282987 activa nAChR  $\alpha 7$  y el 5IA85380 activa nAChR heteroméricos que contienen subunidades  $\beta 2$ .

### V.2.3. EL PNU120596 REVIERTE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR EL PNU282987

Con el objetivo de determinar si una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del nAChR  $\alpha 7$  era capaz de activar vías de protección, realizamos una serie de experimentos encaminados a determinar si la acción del agonista  $\alpha 7$  con su modulador alostérico, que si produjeron un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Fig. 22 A y C), eran capaces de proteger las células SH-SY5Y frente la toxicidad inducida por AO.



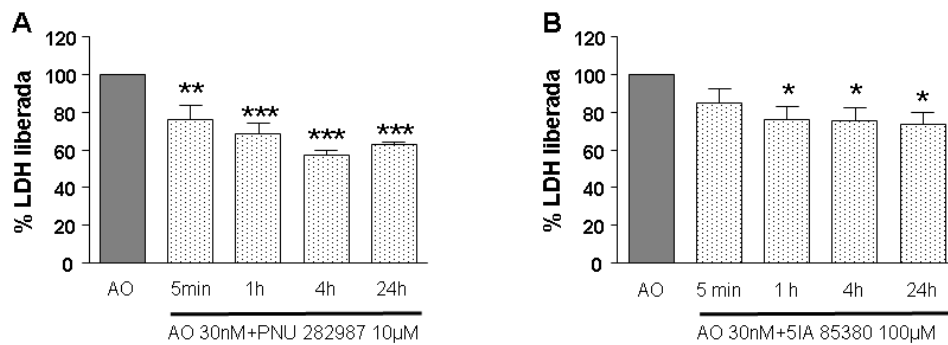
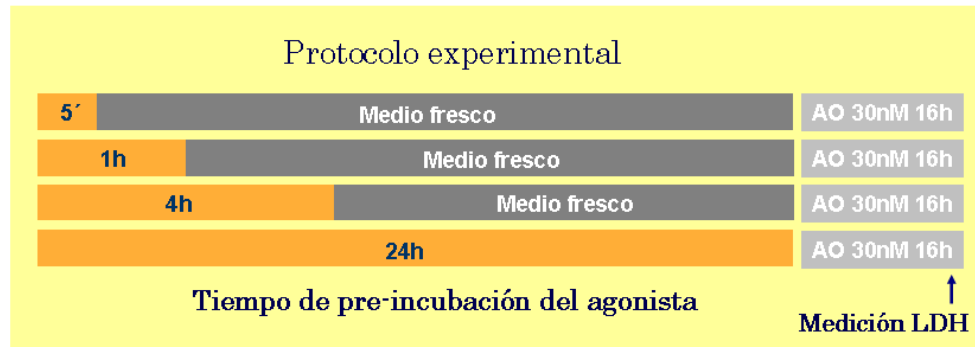
**Figura 23. El modulador selectivo  $\alpha 7$  PNU120596 revierte el efecto protector inducido por el agonista selectivo  $\alpha 7$  PNU282987.** El modulador alostérico PNU120596 10  $\mu\text{M}$  (PNU 12) se pre-incubó 15 minutos y co-incubó durante 24h con el agonista selectivo  $\alpha 7$  el PNU282987 10  $\mu\text{M}$  (PNU 28). Los datos se normalizaron con respecto a la muerte total inducida por el AO 30 nM incubado durante 16 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m. de 8 experimentos independientes por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  respecto del AO; ### $p < 0.001$  respecto del PNU 28. Se realizó un análisis ANOVA de una vía con un test de Newman Keuls.

Curiosamente, al asociar el agonista y el modulador, el agonista perdió su efecto protector (Fig. 23). Por tanto, estos resultados sugerían que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el nAChR  $\alpha 7$  no consigue activar la vía de señalización de supervivencia que podría estar activando el agonista  $\alpha 7$  por si solo.

#### **V.2.4. DEPENDENCIA DEL $\text{Ca}^{2+}$ EXTRACELULAR EN LOS PROCESOS DE NEUROPROTECCIÓN MEDIADOS POR ESTIMULACIÓN DE nAChR DEL SUBTIPO $\alpha 7$ Y $\beta 2^*$ .**

La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en los procesos de neuroprotección mediados por nAChR es un hecho bastante aceptado. Así, por ejemplo, múltiples estudios demuestran que la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular produce una reversión de los efectos neuroprotectores de agonistas nicotínicos como 5IA85380 (Ueda *et al.*, 2008) o nicotina (Dajas-Bailador *et al.*, 2000).

Sin embargo, los datos hasta ahora presentados en este trabajo, apuntan a que la protección mediada por el PNU282987 podría ser independiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. El PNU282987, a la concentración protectora de 10  $\mu\text{M}$ , no produjo una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular significativa (Fig. 22 A y C) e incluso la presencia del modulador, que incrementó el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, revirtió su efecto protector. Sin embargo, el agonista 5IA85380 si fue capaz de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a la concentración que mostró ser protector (Fig. 22 B y D). Todos estos resultados nos hicieron plantearnos si la protección ofrecida por el 5IA85380 podría ser dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la del PNU282987 no.



**Figura 24. Tiempo-dependencia de la citoprotección mediada por PNU282987 (A) y 5IA85380 (B).** Las células se incubaron con una concentración protectora de PNU282987 (10  $\mu$ M) y 5IA85380 (100  $\mu$ M) durante 5 min, 1 h, 4h ó 24 h, a continuación se retiró el agonista y se añadió medio DMEM fresco hasta completar 24 h; transcurrido este tiempo, se añadió el citotóxico, AO a la concentración de 30 nM durante 16h. Al final se evaluó la viabilidad mediante la prueba de LDH. (protocolo panel superior). Las figuras **(A)** y **(B)** muestran la media  $\pm$  s.e.m. de los valores de LDH normalizados respecto al AO de 6 cultivos diferentes por triplicado. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  respecto del AO, aplicando un ANOVA de una vía con un test de Newman Keuls.

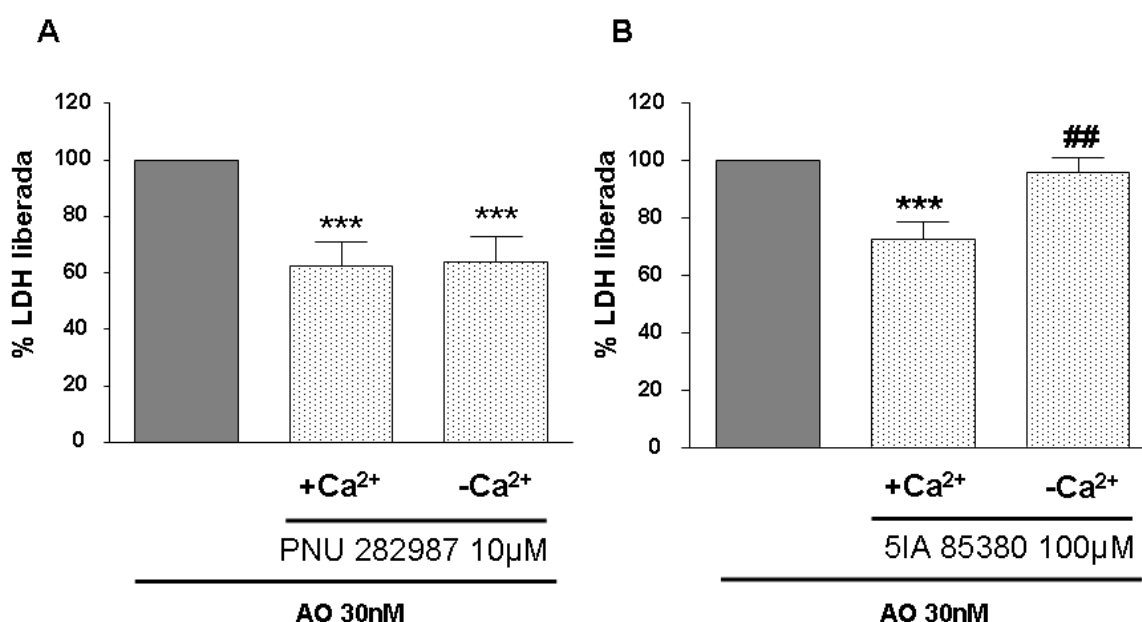
Para determinar la influencia de la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  en los efectos neuroprotectores mediados por los nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$ , se realizaron experimentos de protección de los agonistas PNU282987 y 5IA85380 en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Debido a que la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular puede llegar a ser un estímulo tóxico *per se*, se realizó un curso temporal para determinar el tiempo mínimo de presencia de agonista para conseguir un efecto protector máximo.

El PNU282987 redujo los niveles de LDH liberados al medio extracelular en las células lesionadas con AO y dicha reducción fue significativa a partir de los 5 min de

exposición al agonista nAChR  $\alpha 7$  (Fig. 24 B). En el caso del 5IA85380, la protección fue significativa a partir de 1 h (Fig. 24 C).

Para unificar criterios, se seleccionó el tiempo de pre-incubación de 4h para ambos agonistas ya que a este tiempo se obtuvo un efecto protector similar al obtenido tras 24 h de exposición al agonista (Fig. 24 A y B).

A continuación se incubaron los agonistas durante 4 h en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular siguiendo el protocolo descrito en la parte superior de la figura 24. Los resultados mostraron que la protección mediada por 5IA85380 era dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 25 B) pero la inducida por PNU282987, no (Fig. 25 A).



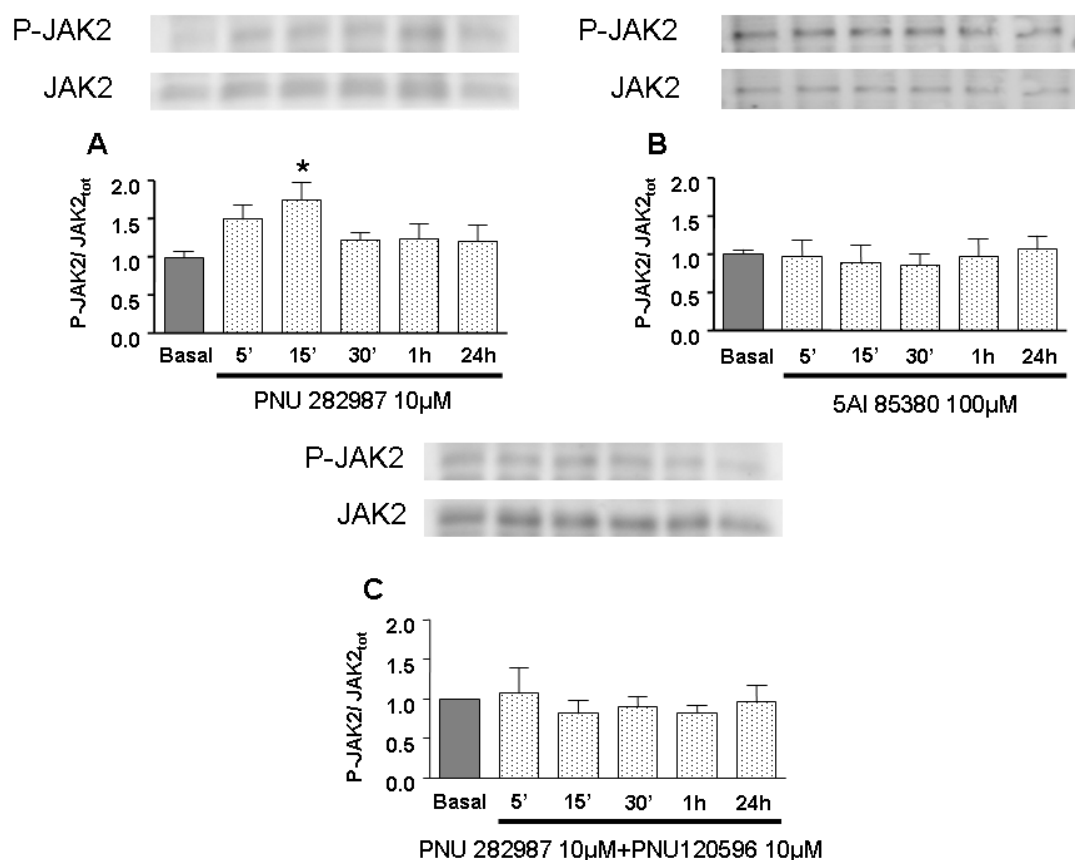
**Figura 25.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependencia de los efectos neuroprotectores mediados por PNU282987 y 5IA85380.** Los agonistas nicotínicos se pre-incubaron durante 4h en solución control con  $\text{Ca}^{2+}$  y sin  $\text{Ca}^{2+}$  y, posteriormente se reemplazó el medio por DMEM fresco durante 20h. A continuación, las células se trataron con AO 30 nM durante 16 h más. La figura (A) muestra la protección mediada por PNU282987 10  $\mu\text{M}$  en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y (B) representa la dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en la protección mediada por 5IA85380 100  $\mu\text{M}$ . Los datos corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. de LDH normalizada respecto al OA de 10 cultivos diferentes por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  respecto del AO, ## $p < 0.01$  respecto del 5IA85380 con  $\text{Ca}^{2+}$ . Se analizó con un ANOVA de una vía y un test de Newman Keuls.



Por tanto, parecía que una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la activación de nAChR  $\beta 2^*$  era necesaria para conseguir activar las vías de señalización intracelular responsables de su efecto neuroprotector. Sin embargo, en el caso del nAChR  $\alpha 7$ , el agonista  $\alpha 7$  PNU282987, por si solo, no fue capaz de inducir una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y su efecto protector no fue dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. En conclusión, la protección mediada por nAChR  $\beta 2^*$  parece depender de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la mediada por nAChR  $\alpha 7$  parece ser independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

#### **V.2.5. LA CINASA JAK-2 ESTÁ IMPLICADA EN LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LOS nAChR $\alpha 7$ PERO NO EN LA MEDIADA POR nAChR $\beta 2^*$ .**

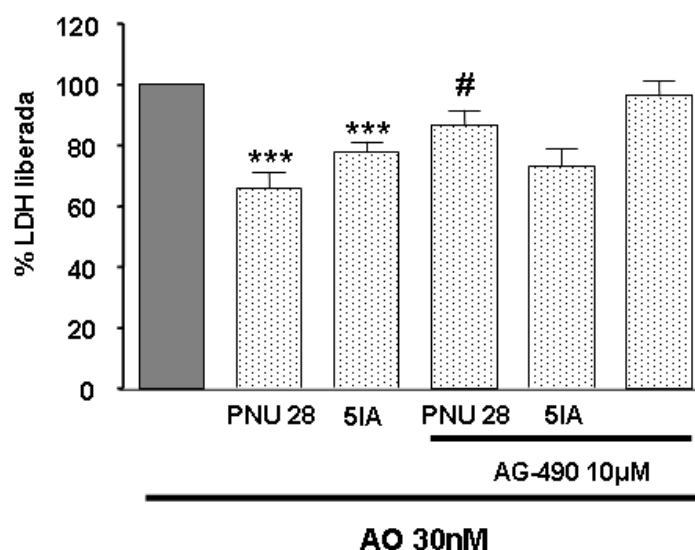
Se sabe que JAK-2 es una proteína que se asocia físicamente al nAChR  $\alpha 7$  y que se activa fosforilándose por estimulación nicotínica (Shaw *et al.*, 2002). Quisimos determinar si la activación de los nAChR del subtipo  $\alpha 7$  y/o  $\beta 2^*$  podrían activar esta cinasa en nuestras condiciones experimentales. Para ello, tratamos las células SH-SY5Y con PNU282987 10  $\mu\text{M}$ , PNU282987 10  $\mu\text{M}$  más PNU120596 10  $\mu\text{M}$  y 5IA85380 100  $\mu\text{M}$  durante diferentes tiempos (5, 15, 30 min y 1 y 24 h) y, al final, analizamos por western blot JAK-2. Las células tratadas con PNU282987 10  $\mu\text{M}$  incrementaron casi al doble la fosforilación de esta proteína a los 15 minutos y a partir de este tiempo la fosforilación cayó a niveles basales (Fig. 26 A). En el caso del 5IA85380, no observamos activación de esta proteína a ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 26 B). Cuando asociamos el agonista  $\alpha 7$  con el modulador alostérico tampoco observamos incremento significativo de P-JAK-2 (Fig. 26 C).



**Figura 26. Fosforilación diferencial de JAK-2 por PNU282987 10 µM (A), 5IA85380 100 µM (B) y PNU282987 10 µM +PNU120596 10 µM (C).** Distintos tiempos de incubación de agonistas (5 min, 15 min, 30 min, 1h y 24 h) se realizaron para cuantificar P-JAK-2 (immunoblot de arriba) y JAK-2 total (immunoblot abajo). Los histogramas representan la cuantificación densiométrica de P-JAK-2 normalizada con respecto a JAK total. Los valores son la media  $\pm$  s.e.m. de al menos 4 cultivos diferentes. \* $p < 0.05$  respecto del basal. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

Está descrito en la literatura que la activación de JAK-2 está implicada en el efecto neuroprotector inducido por nicotina al interaccionar con el nAChR  $\alpha 7$  en neuronas lesionadas por  $A\beta_{1-42}$  (Shaw *et al.*, 2002). Por esta razón y porque habíamos visto que el agonista  $\alpha 7$  inducía la fosforilación de JAK-2, decidimos evaluar si el efecto protector del PNU282987 frente la lesión inducida por AO podría perderse en presencia de un inhibidor de esta cinasa, el AG-490. Para corroborar que la activación de JAK-2 estaba relacionada con su acción sobre los receptores  $\alpha 7$  y no con los  $\beta 2^*$ , también incluimos el 5IA85380.

Tal como puede observarse en la figura 27, el efecto protector del PNU282987 fue revertido por completo con el AG-490 pero no afectó a la protección ofrecida por el 5IA85380. Por tanto, estos resultados nos indican que JAK-2 está relacionada, en una etapa muy inicial, con la activación de la cascada de supervivencia asociada al nAChR  $\alpha 7$ .

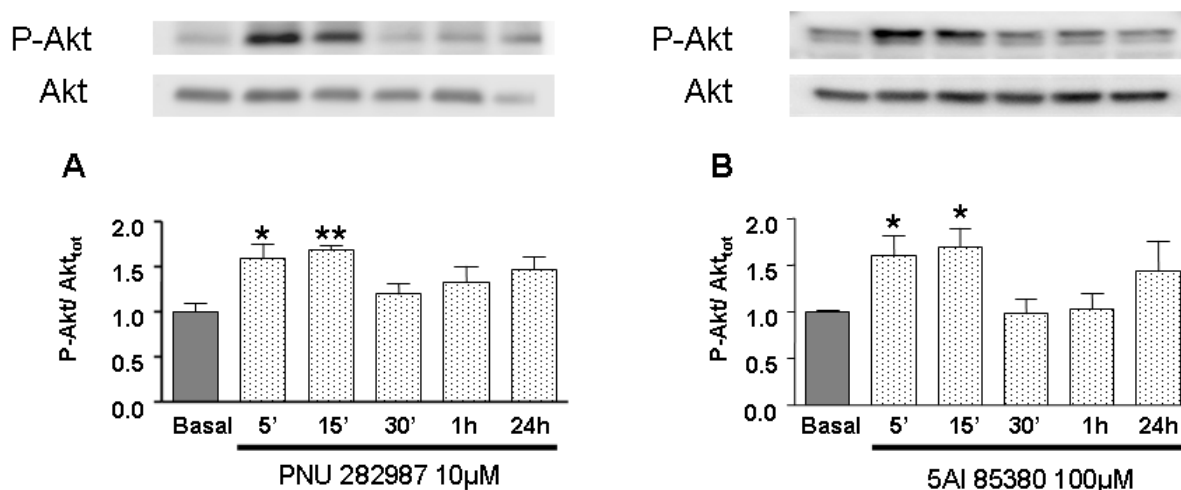


**Figura 27. El inhibidor de JAK-2 (AG-490) revierte la protección mediada por PNU282987 y no la de 5IA85380.** La muerte celular inducida por AO 30 nM durante 16h se normalizó al 100% (columna gris). La pre (30 min) y co-incubación del inhibidor AG-490 10  $\mu$ M con los agonistas nicotínicos revirtió exclusivamente el efecto protector del agonista PNU282987 10  $\mu$ M y no afectó al del 5IA85380 100  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 8 experimentos de cultivos diferentes. \*\*\* $p$  < 0.001 respecto del OA; # $p$  < 0.05 respecto del PNU282987. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

#### V.2.6. LA VÍA PI3K/Akt ESTÁ IMPLICADA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DEL PNU282987 Y DEL 5IA85380.

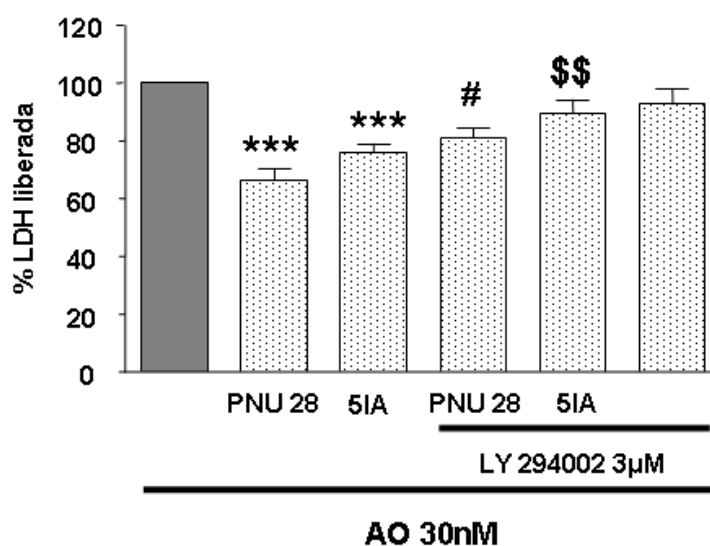
Se sabe que múltiples agonistas nicotínicos producen activación de la vía PI3K/Akt (Kihara *et al.*, 2001). En nuestro modelo, hemos visto anteriormente (Fig. 26 A) que la activación del nAChR  $\alpha 7$  produce fosforilación de JAK-2, la cual tiene como sustrato de fosforilación a PI3K/Akt (Shaw *et al.*, 2002). Para comprobar si la activación

de los agonistas  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  produciendo la activación de Akt realizamos medidas de fosforilación de ésta mediante western blot. La incubación con PNU282987 y 5IA85380 produjeron una fosforilación de Akt que fue estadísticamente significativa a los 5 y 15 minutos (Fig. 28).



**Figura 28. Fosforilación de Akt por PNU282987 10  $\mu$ M (A) y 5IA85380 100  $\mu$ M (B).** Distintos tiempos de incubación de agonistas (5 min, 15 min, 30 min, 1h y 24 h) se realizaron para cuantificar P-Akt (inmunoblot de arriba) y Akt total (inmunoblot de abajo). Los histogramas representan la cuantificación densiométrica de P-Akt normalizada con respecto a Akt total. Los valores son la media  $\pm$  s.e.m. de al menos 4 cultivos diferentes. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto del basal. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

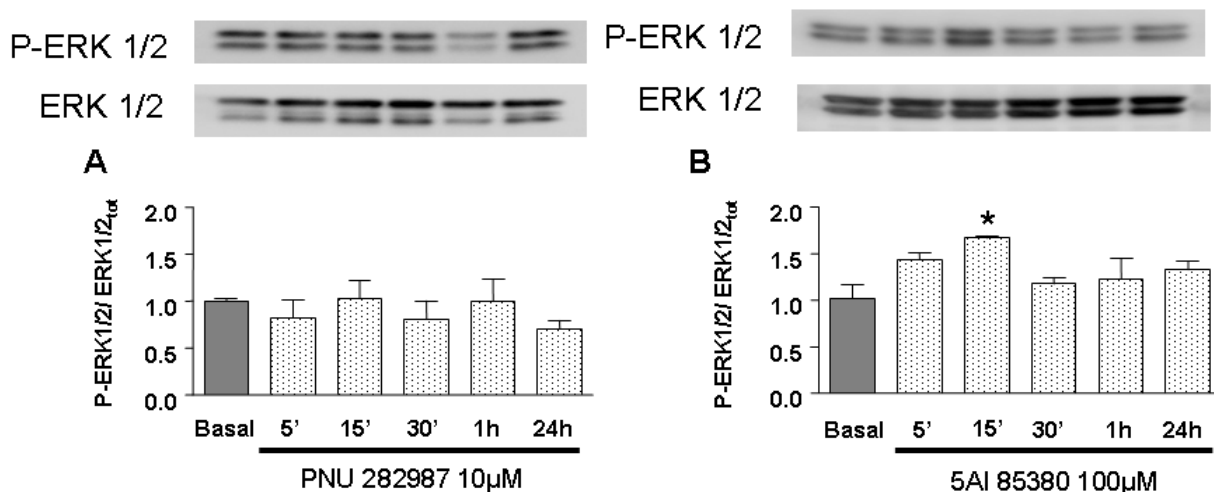
Para determinar si la protección ofrecida por la activación de los nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  era dependiente de la activación de PI3K/Akt pre-incubamos las células con el inhibidor de PI3K, el LY 294002 (3  $\mu$ M). Tal como puede observarse en la figura 29, la protección ofrecida por el PNU282987 y el 5IA85380 frente a la lesión inducida por AO fue revertida por el inhibidor de PI3K, lo que indica que la protección de ambos agonistas es dependiente de la activación de PI3K.



**Figura 29. El inhibidor de PI3K (LY 294002) revierte la protección mediada por PNU282987 y 5IA85380.** La muerte celular inducida por la exposición a AO 30 nM durante 16h se normalizó al 100% (columna gris). La pre (15 min) y co-incubación del inhibidor LY 294002 3µM con los agonistas nicotínicos revirtió el efecto protector del agonista PNU282987 10 µM y 5IA85380 100 µM. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 9 experimentos de cultivos diferentes. \*\*\* $p < 0.001$  respecto del OA; # $p < 0.05$  respecto del PNU282987; \$\$ $p < 0.01$  respecto de 5IA85380. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

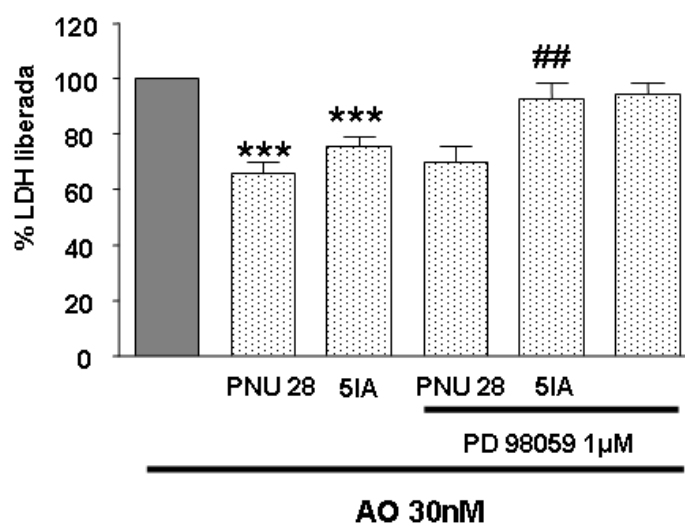
#### V.2.7. ERK 1/2 ESTÁ IMPLICADA EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE 5IA85380 PERO NO EN EL DE PNU282987.

La ruta intracelular de las MAPK también se ha implicado en procesos de neuroprotección mediados por activación de nAChR (Egea *et al.*, 2007). Para determinar si el PNU282987 y/o el 5IA85380 eran capaces de activar ERK 1/2 se realizaron medidas de fosforilación de esta cinasa por la técnica de western blot. Como muestra la figura 30 A, el PNU282987 por sí solo no produjo fosforilación de ERK 1/2 a ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, el 5IA85380 incrementó los niveles de P-ERK 1/2 de forma significativa a los 15 min de incubación (Fig. 30 B).



**Figura 30. La fosforilación ERK 1/2 fue inducida por 5IA85380 100 µM y no por PNU282987.** Distintos tiempos de incubación de agonistas (5 min, 15 min, 30 min, 1h y 24 h) se realizaron para cuantificar P-ERK 1/2 (inmunoblot de arriba) y ERK 1/2 total (inmunoblot de abajo). Los histogramas representan la cuantificación densiométrica de P-ERK 1/2 normalizada con respecto a ERK 1/2 total. Los valores son la media  $\pm$  s.e.m. de al menos 4 cultivos diferentes. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto del basal. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

Para corroborar que la activación de las MAPK estaba implicada en el efecto neuroprotector mediado el 5IA85380 y no en el de PNU282987, empleamos el inhibidor de MEK, el PD 98059. Como muestra la figura 31, el tratamiento de las células con PD 98059 revirtió la protección inducida por el 5IA85380 pero no la ofrecida por PNU282987. De ahí que pudiéramos deducir que esta vía de supervivencia se inducía tras la activación de receptores  $\beta 2^*$  y no tras la activación de receptores  $\alpha 7$ .



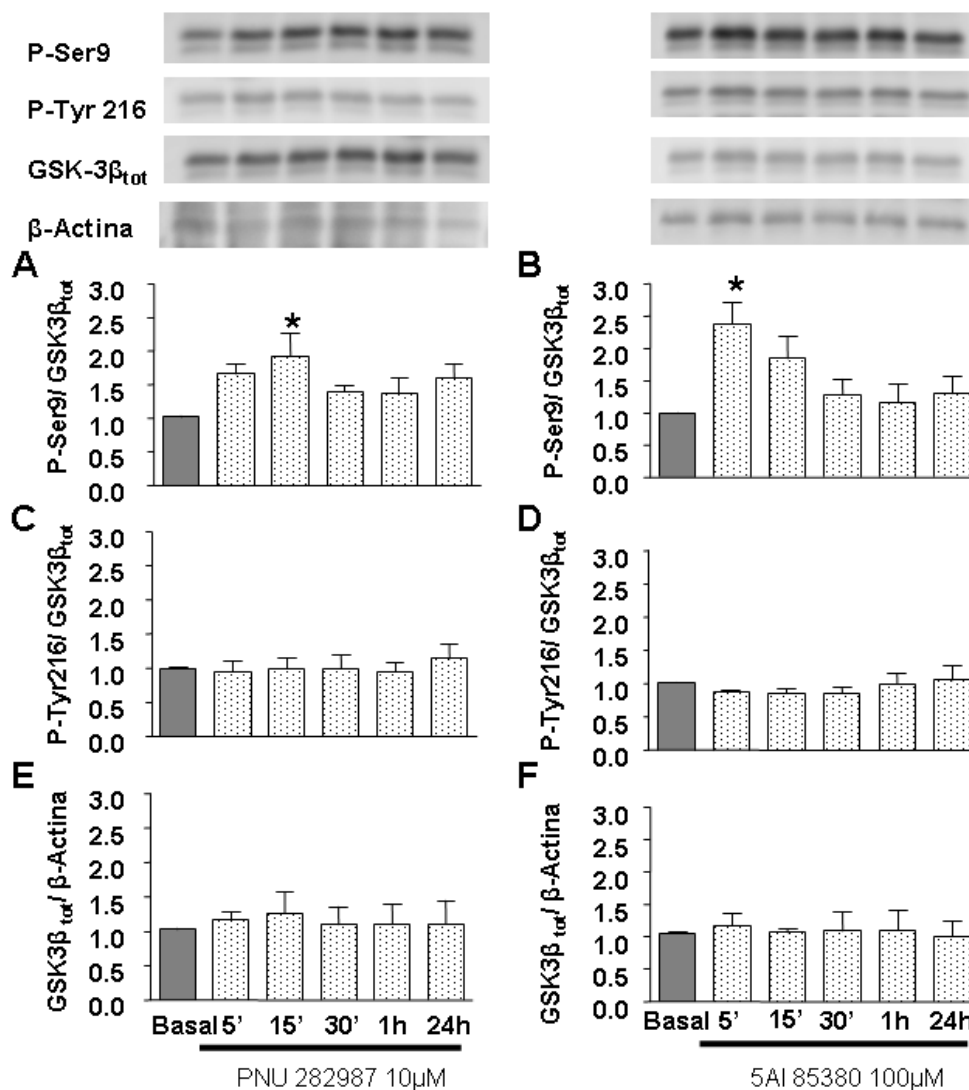
**Figura 31. El inhibidor de MEK (PD 98059) revierte la protección mediada por 5IA85380.** La muerte celular inducida por AO 30 nM durante 16h se normalizó al 100% (columna gris). La pre (15 min) y co-incubación del inhibidor PD 98059 1μM con los agonistas nicotínicos revirtió el efecto protector del agonista 5IA85380 100 μM y no tuvo efecto sobre la protección mediada por el PNU282987 10 μM. Los datos representan la media ± s.e.m. de 10 experimentos de cultivos diferentes. \*\*\* $p < 0.001$  respecto del OA; ## $p < 0.01$  respecto del PNU282987. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

#### V.2.8. IMPLICACIÓN DE GSK-3β EN LA NEUROPROTECCIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE nAChR α7 Y β2\*.

GSK-3β es una cinasa sustrato de PI3K/Akt. Se sabe que la fosforilación de su Ser 9 por Akt produce su inactivación (Stambolic & Woodgett, 1994). Sin embargo, la fosforilación de su residuo Tyr 216 produce su activación, aunque las cinasas responsables de dicha fosforilación aún no están bien caracterizadas (Hughes *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994).

Para determinar el estado de activación/inactivación de la GSK-3β tras el estímulo de los distintos subtipos de nAChR, medimos estas cinasas por western blot en extractos proteicos de células SH-SY5Y tratadas con PNU282987 (10 μM) o 5IA85380 (100 μM) durante diferentes tiempos. Como muestra en la figura 32, tanto el PNU282987 como el 5IA85380 fueron capaces de aumentar la fosforilación de la Ser 9 de la GSK-3β tras 15 y

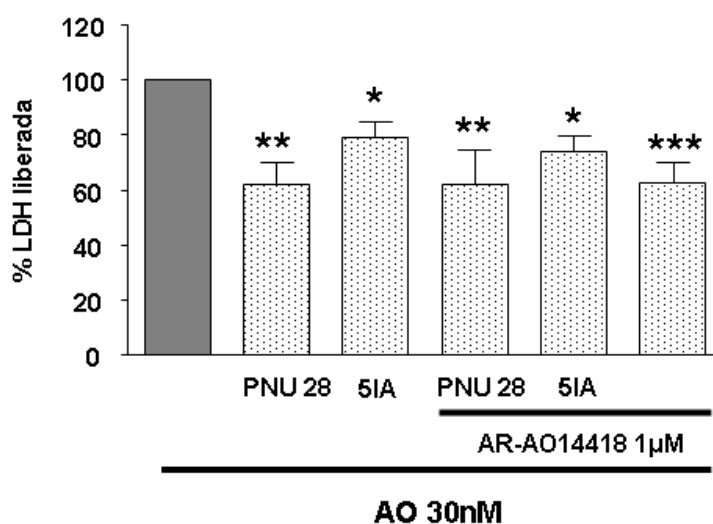
5 minutos de incubación, respectivamente (Fig. 32 A y B). Sin embargo, esta fosforilación disminuyó con el tiempo, no siendo estadísticamente significativa tras 24 horas de pre-incubación del agonista. La fosforilación en el residuo Tyr 216 de la GSK-3 $\beta$  no se vio modificada a ninguno de los tiempos medidos con ninguno de los agonistas (Fig 32 C y D). Tampoco observamos modificaciones en la expresión de la GSK-3 $\beta$  total (Fig. 32 E y F).



**Figura 32. Determinación del estado de activación/inactivación de GSK-3 $\beta$  tras la incubación de las células con PNU282987 y 5IA85380.** Distintos tiempos de incubación de los agonistas (5 min, 15 min, 30 min, 1h y 24 h) se realizaron para cuantificar P-Ser 9, P-Tyr 216, GSK-3 $\beta$  total y  $\beta$ -Actina. Los histogramas representan la cuantificación densiométrica de P-Ser9 (A) y (B); y P-Tyr 216 (C) y (D) normalizada con respecto a GSK-3 total. Los paneles (E) y (F) representan la cantidad de GSK-3 $\beta$  con respecto a la proteína constitutiva  $\beta$ -Actina. Los valores son la media  $\pm$  s.e.m. de al menos 4 cultivos diferentes. \* $p < 0.05$  respecto del basal..

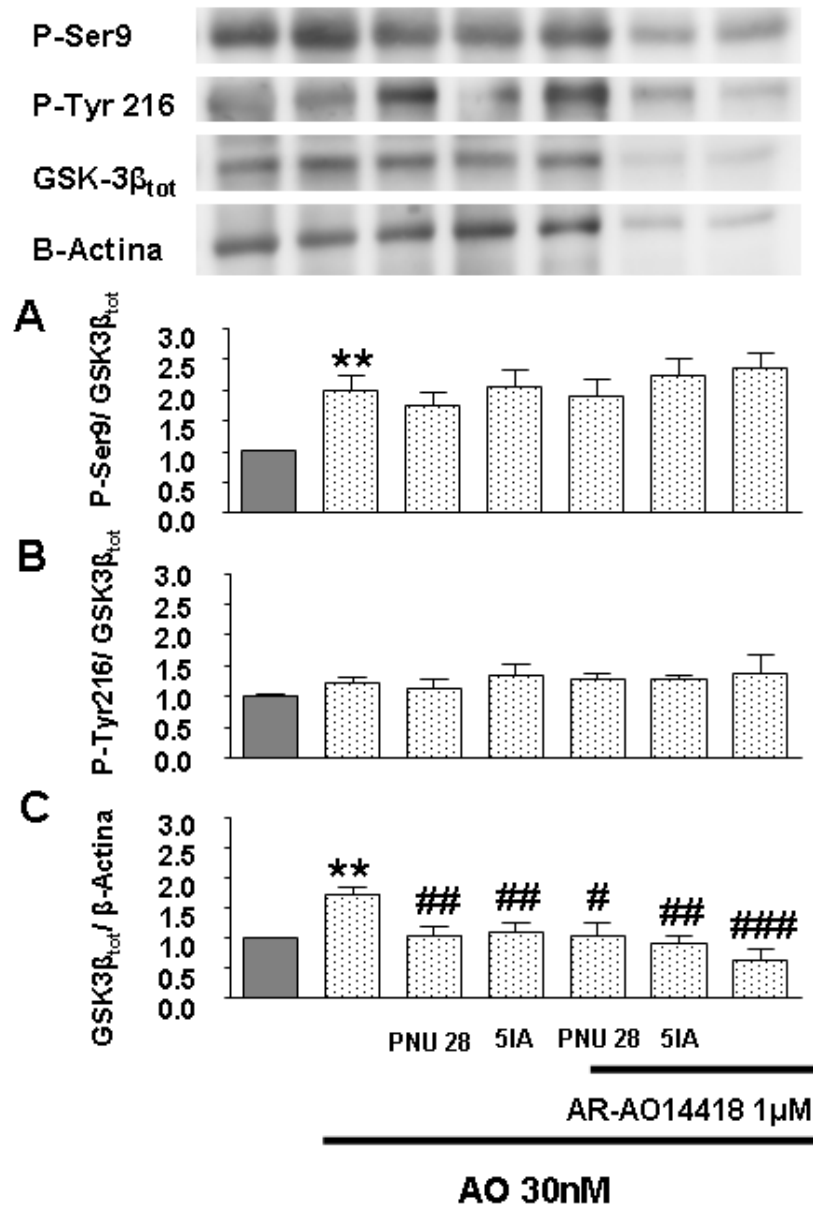


Para determinar si la inhibición de GSK-3 $\beta$  estaba implicada en la protección mediada por el PNU282987 y el 5IA85380, realizamos un experimento de neuroprotección frente a AO en presencia o ausencia de un inhibidor de GSK-3 $\beta$ , el AR-A014418. La figura 33 muestra que el AR-A014418, por sí solo, produjo protección frente al AO; dicha protección no fue estadísticamente diferente de la obtenida con los agonistas nicotínicos solos. Dado que con la combinación de agonista nAChR más AR-A014418 no obtuvimos un efecto neuroprotector mayor, podemos deducir que ambos agonistas estarían actuando mediante un mecanismo común que implica la inhibición de GSK-3 $\beta$ .



**Figura 33. El inhibidor de GSK-3 $\beta$  (AR-A014418) protege frente a la lesión inducida por AO y no produce un efecto sinérgico en combinación con los agonistas PNU282987 y 5IA85380.** La muerte celular inducida por AO 30 nM durante 16 h se normalizó al 100% (columna gris). El AR-A014418 1 $\mu$ M solo protegió frente a OA. La co-incubación del inhibidor AR-A014418 1 $\mu$ M con los agonistas nicotínicos no produjo un efecto sinérgico en la protección mediada por PNU282987 y 5IA85380. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m. de 10 experimentos de cultivos diferentes. \*\*\* $p$  < 0.001 respecto del OA; \*\* $p$  < 0.01 respecto del PNU282987. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

Debido a que la inhibición de la Ser-9 no se mantiene a las 24 horas de tratamiento con PNU282987 y 5IA85380, pero la inhibición de GSK-3 $\beta$  parece estar implicada en la protección mediada por ambos agonistas (Fig. 33) decidimos evaluar el estado de activación y expresión de GSK-3 $\beta$  bajo el tratamiento con AO. Se realizaron medidas de western blot de esta proteína a las 16 horas de incubación con AO solo o en presencia de los distintos compuestos. Como muestra la figura 34, el AO produjo un aumento significativo de la fosforilación de la Ser-9, respecto del control. La incubación de las células con los agonistas PNU282987 y 5IA85380 no modificaron significativamente la fosforilación de GSK-3 $\beta$ -Ser9. En el caso de la Tyr 216 de la GSK-3 $\beta$ , ésta no se vio modificada ni por el AO ni por los agonistas nicotínicos. Curiosamente, la expresión de GSK-3 $\beta$  total aumentó bajo el tratamiento de AO y los agonistas nicotínicos impidieron dicho aumento de expresión a niveles casi basales. El incremento de GSK-3 $\beta$  total inducido por AO también fue inhibido por AR-A014418. Cuando combinamos el AR-A014418 con los agonistas nicotínicos el bloqueo del aumento de expresión de GSK-3 $\beta$  permaneció igual (Fig. 34). Por tanto, estos resultados vendrían a corroborar la acción de ambos agonistas nicotínicos sobre GSK-3 $\beta$ .

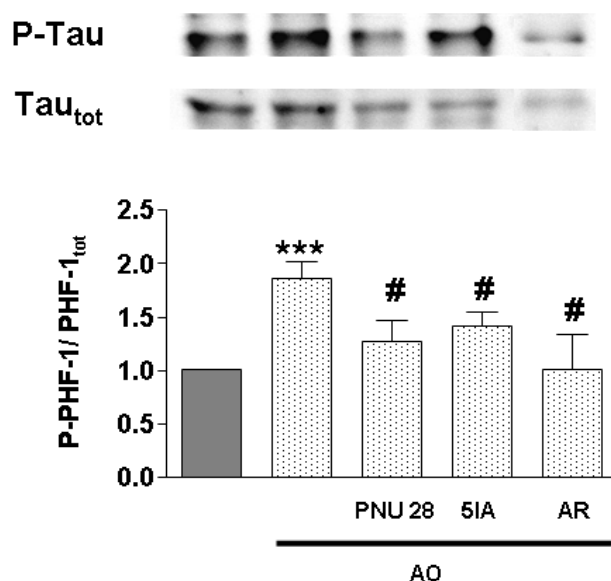


**Figura 34. Determinación del estado de activación/inactivación de GSK-3 $\beta$  en células tratadas con AO.** Se recogieron muestras de proteína de células que fueron pre-incubadas 24 h con PNU282987 10  $\mu$ M, 5IA85380 100 $\mu$ M, AR-A014418 1  $\mu$ M o la combinación de AR -A014418 con los agonistas y que posteriormente se trataron con AO 30 nM durante 16 h. Los histogramas representan la cuantificación densiométrica de P-Ser-9 (A) y P-Tyr-216 (B) normalizada con respecto a GSK-3 total y (D) GSK-3 total normalizada respecto de la proteína constitutiva  $\beta$ -Actina. Los valores son la media  $\pm$  s.e.m. de 4 cultivos diferentes. \*\* $p < 0.01$  respecto del basal; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  respecto del AO. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

### V.2.9. ACCIÓN DE PNU282987 Y 5IA85380 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA $\tau$

Tal como se ha mencionado con anterioridad, el AO es un inhibidor de fosfatasa que defosforilan a  $\tau$ . Además, una de las cinasas implicadas en la fosforilación de  $\tau$  es GSK-3 $\beta$ , concretamente GSK-3 $\beta$  fosforila un residuo específico como diana en la estructura de  $\tau$  que se encuentra en la Ser396/404 (Cho & Johnson, 2004).

Quisimos determinar cómo afectaba la incubación de los agonistas a la fosforilación de este residuo en  $\tau$ . Para ello, realizamos medidas por western blot en células tratadas con AO 30 nM durante 16 horas y células que anteriormente habían sido pre-incubadas durante 24 horas con los agonistas PNU282987 y 5IA85380. Como muestra la figura 35, el PNU282987, el 5IA85380 y el AR-A014418 redujeron de forma significativa la fosforilación de  $\tau$  inducida por AO.



**Figura 35. Efecto de los agonistas nicotínicos y el AR-A014418 sobre el estado de fosforilación de  $\tau$  en células tratadas con AO.** Se recogieron muestras de proteína de células que fueron pre-incubadas 24 h con PNU282987 10  $\mu$ M, 5IA85380 100 $\mu$ M o AR-A014418 1  $\mu$ M y que posteriormente se trataron con AO 30 nM durante 16 h. Los histogramas representan la cuantificación densiométrica de P-Ser 396/405 normalizada con respecto a tau total. Los valores son la media  $\pm$  s.e.m. de 5 cultivos diferentes. \*\*\* $p$  < 0.001 respecto del basal; # $p$  < 0.05 respecto del AO. ANOVA de una vía con un test de Newman-Keuls.

## VI. DISCUSIÓN GENERAL

### VI.1. SEÑALES DE $\text{Ca}^{2+}$ Y LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS MEDIADAS POR RECEPTORES $\alpha 7$ Y NO- $\alpha 7$ EN LA CÉLULA CROMAFÍN BOVINA

Aunque el papel funcional del nAChR  $\alpha 7$  en el sistema nervioso central (SNC) está bien caracterizado (Barrantes *et al.*, 1995; Shimohama *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2004; Ulloa, 2005), su función fisiológica en el sistema nervioso periférico todavía no está del todo esclarecida (Fucile *et al.*, 2005). En el modelo celular que hemos estudiado en esta tesis, se ha descrito que la expresión de nAChR  $\alpha 7$  en membranas plasmáticas aisladas de células cromafines bovinas es similar ( $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BGT } 49.9 \pm 7.6 \text{ fmol/mg protein}$ ) (El-Hajj *et al.*, 2007) al encontrado en membranas de hipocampo de rata ( $[^{125}\text{I}] \alpha\text{BGT } 51.1 \text{ fmol/mg protein}$ ) (Garcia-Guzman *et al.*, 1995). A pesar de que el número de receptores sea similar en el SNC y en la célula cromafín, aún no hay evidencias directas que demuestren que la activación de los AChR  $\alpha 7$  de la célula cromafín puedan ocasionar un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y, la consiguiente, liberación de catecolaminas (Afar *et al.*, 1994; Tachikawa *et al.*, 2001).

En un estudio previo de nuestro grupo habíamos descrito que la señales inducidas por ACh podían bloquearse parcialmente por antagonistas  $\alpha 7$  selectivos como la BGT, MLA o  $\alpha$ -conotoxina Iml, lo que indicaba, de forma indirecta, que las células cromafines bovinas contenían un nAChR  $\alpha 7$  funcional (Lopez *et al.*, 1998). En estos momentos dada la disponibilidad de herramientas farmacológicas más selectivas como el PNU282987, un agonista  $\alpha 7$ , y el PNU120596, un modulador alostérico positivo de estos receptores, nos propusimos retomar la pregunta de sí la célula cromafin bovina contenía un nAChR  $\alpha 7$  funcional, entendiendo como funcional que fuera capaz de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y liberar catecolaminas, tras su activación.

La mayor parte de este estudio ha consistido en medir señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en células cromafines bovinas cargadas con la sonda fluorescente sensible

a  $\text{Ca}^{2+}$ , Fluo-4 o transfectadas con aequorinas dirigidas al citosol o la mitocondria. Cada metodología ha aportado una información complementaria. Las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  con Fluo-4 se han realizado en un lector de placas, donde hemos podido hacer un análisis cinético de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , en términos de unidades de fluorescencia, tras una inyección única del agonista. La ventaja de medir señales de fluorescencia en placas de 96 pocillos ha sido la de poder realizar un gran número de variables en un período relativamente corto. Sin embargo, las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el uso de aequorinas, nos ha permitido medir de forma selectiva los cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el citosol como en la mitocondria, conocer la concentración que dicho catión alcanza en dichos compartimentos celulares y, por último, al estar las células en un sistema de perfusión continua, hemos podido estimular las células en repetidas ocasiones y estudiar en una misma población la modificación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  ante distintos estímulos.

Midiendo señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en un lector de placas, en células cargadas con Fluo-4, hemos caracterizado inicialmente dos tipos de respuestas: la  $\alpha 7$  y la no- $\alpha 7$ . Al comienzo del estudio empleamos la nicotina con la idea de estimular ambos subtipos de nAChR, los  $\alpha 7$  y los no- $\alpha 7$ . Tal como ya conocíamos de la literatura y de nuestra propia experiencia (Ridley *et al.*, 2002), la nicotina inducía un incremento concentración-dependiente en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Aunque los incrementos del  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inducidos por nicotina se bloquearon completamente por el antagonista nicotínico no selectivo mecamilamina, éstos incrementos no fueron modificados por antagonistas nicotínicos  $\alpha 7$  selectivos como la BGT o MLA. Por tanto, estos resultados sugerían que la nicotina estaría actuando preferentemente sobre receptores no- $\alpha 7$ , ya que su respuesta no se bloqueaba por antagonistas selectivos  $\alpha 7$ .

Con la idea de profundizar en el efecto mediado por nAChR no- $\alpha 7$ , empleamos el 5IA85380, un nuevo agonista nicotínico que presenta una gran afinidad por los nAChR  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 6\beta 2$  y en menor medida por el subtipo  $\alpha 3\beta 4$ . Dado que en las células cromafines bovinas no se ha identificado la subunidad  $\beta 2$ , el 5IA85380 estaría estimulando

potencialmente receptores del subtipo  $\alpha 3\beta 4^*$ , con una afinidad cinco veces superior a la del subtipo  $\alpha 7$  (Mukhin *et al.*, 2000). Cuando estimulamos las células cromafines con el 5IA85380, observamos un patrón muy similar al obtenido con la nicotina, es decir, ofreció incrementos de la  $[Ca^{2+}]_c$  en forma concentración-dependiente y dichos incrementos se bloquearon completamente por mecamilamina pero no por BGT. Por tanto, llegamos a concluir que tanto la nicotina como el 5IA85380 estarían actuando sobre nAChR no-7. Estos resultados, en cierto modo, estaban de acuerdo con los descritos previamente en células PC12, una línea tumoral derivada de células cromafines (Afar *et al.*, 1994; Innocent *et al.*, 2008).

Una vez caracterizada la respuesta no- $\alpha 7$ , nos propusimos inducir señales de  $Ca^{2+}$  mediadas por estimulación directa de los nAChR  $\alpha 7$ . Para ello utilizamos un nuevo agonista nicotínico selectivo de los receptores  $\alpha 7$ , el PNU282987. El PNU282987 no solo está descrito como agonista selectivo de este receptor  $\alpha 7$  (Bodnar *et al.*, 2005; Hajos *et al.*, 2005), sino que también parece inducir un ligero bloqueo de los nAChR  $\alpha 3\beta 4$  (Wishka *et al.*, 2006). A pesar de la selectividad descrita para el PNU282987, cuando estimulamos las células cromafines con este agonista no pudimos detectar incrementos en la  $[Ca^{2+}]_c$ , salvo a concentraciones por encima de 30  $\mu M$ . Curiosamente, los incrementos de  $[Ca^{2+}]_c$  inducidos por altas concentraciones de PNU282987 no se bloquearon por BGT pero si por mecamilamina. Estos resultados, en un principio, nos estaban indicando que este agonista  $\alpha 7$  no era capaz de inducir señales de  $Ca^{2+}$  sensibles a BGT o  $\alpha 7$ .

En vista de estos resultados, empleamos la colina, un producto endógeno derivado de la degradación de la ACh, que se comporta como agonista nicotínico  $\alpha 7$  (Noble *et al.*, 1978). Curiosamente, encontramos un perfil muy parecido al obtenido con el PNU282987. La colina, a concentraciones por encima de 1 mM, producía señales de  $Ca^{2+}$  que solo se bloqueaban por mecamilamina pero no por BGT. La activación de los nAChR no- $\alpha 7$  por colina estaba de acuerdo con datos mostrados en células PC12 y en neuronas de ganglio cervical superior de rata (Alkondon *et al.*, 1997; Seddik *et al.*, 2003), aunque

hay otros resultados que demuestran que la colina inhibe la respuesta  $\alpha 3\beta 4$  bovina expresada en ovocitos de *Xenopus* (Gonzalez-Rubio *et al.*, 2006).

Dado que no habíamos sido capaces de registrar señales de  $\text{Ca}^{2+}$  con los agonistas selectivos  $\alpha 7$  y, que cuando las obteníamos, éstas no eran sensibles a BGT, decidimos estudiar si un modulador alostérico positivo de los receptores  $\alpha 7$ , podría potenciar una señal mediada por estos receptores, y así, poder desenmascararlo. Para ello empleamos el PNU120596. El modulador alostérico selectivo  $\alpha 7$  PNU120596, no ejerce efecto sobre el nAChR  $\alpha 3\beta 4$  (Gronlien *et al.*, 2007) pero en células PC12 (Dickinson *et al.*, 2007), SHSY-5Y (Innocent *et al.*, 2008) o neuronas de hipocampo (Lopez-Hernandez *et al.*, 2009) se ha visto que puede potenciar una respuesta  $\alpha 7$ .

Uno de los hallazgos más interesantes de esta tesis ha sido que concentraciones bajas de nicotina o de los agonistas  $\alpha 7$  PNU282987 o colina, que por sí mismas no son capaces de generar un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , en presencia del modulador alostérico PNU120596, pueden generar respuestas de 15-20 veces superiores a la basal; esta señal potenciada se abole por completo por concentraciones nanomolares de los antagonistas  $\alpha 7$  BGT y MLA. En células PC12 (Nakayama *et al.*, 2001) se ha descrito que concentraciones bajas de nicotina producen una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del subtipo  $\alpha 7$ , sin embargo, cuando se aumenta la concentración de este agonista, se estimulan preferentemente receptores no- $\alpha 7$ .

En cuanto a la interacción del modulador alostérico con el receptor, aunque se ha demostrado que el PNU120596 abre los canales  $\alpha 7$  incluso en su estado desensibilizado (Bodnar *et al.*, 2005; Gronlien *et al.*, 2007), nosotros y otros (Hurst *et al.*, 2005) en células SHSY-5Y, hemos observado que bajo una exposición continuada de agonista, se produce una disminución de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma dependiente de tiempo.

Con los resultados obtenidos hasta este punto pudimos establecer las condiciones experimentales para estudiar una respuesta no- $\alpha 7$  (nicotina a 30  $\mu\text{M}$ ) y una respuesta  $\alpha 7$  (combinación del agonista  $\alpha 7$  PNU282987, a una concentración igual o inferior a 10  $\mu\text{M}$ ,



más modulador  $\alpha 7$  PNU 12059). Según la subunidades de nAChR descritas en la célula cromafín bovina (Garcia-Guzman *et al.*, 1995; Campos-Caro *et al.*, 1997). Entendemos que la respuesta  $\alpha 7$  que hemos registrado está mediada, fundamentalmente, por un receptor  $\alpha 7$  homomérico ya en estas células se ha descrito que la mayoría de los receptores  $\alpha 7$  son homoméricos, siendo el porcentaje de receptores  $\alpha 7\alpha 3\beta 4$  muy bajo (El-Hajj *et al.*, 2007). Además, los resultados obtenidos muestran un mayor bloqueo con mecamilamina de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por el no- $\alpha 7$  que frente a la respuesta  $\alpha 7$ . Dado que el antagonista mecamilamina tiene más afinidad por receptores  $\alpha\beta$  heteroméricos que  $\alpha 7$  homoméricos (Chavez-Noriega *et al.*, 1997; Frazier *et al.*, 1998; Papke *et al.*, 2001); estos resultados parecen sugerir que el subtipo al que hemos llamado  $\alpha 7$  sería un receptor homomérico.

Y, en el caso de la respuesta no- $\alpha 7$ , hay datos bibliográficos que determinan que la secreción de catecolaminas en las células cromafines está regulada mayoritariamente por receptores no- $\alpha 7$  constituidos por subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$  y/o  $\alpha 5$  pudiendo adoptar ésta última la función de una subunidad  $\beta 4$  (Criado *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1996; Campos-Caro *et al.*, 1997; Free & McKay, 2003). Por tanto, pensamos que este subtipo de nAChR heteromérico estaría regulando las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  no- $\alpha 7$ .

Cuando analizamos el pico máximo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el nAChR  $\alpha 7$  modulado, observamos que ésta disminuye a medida que aumenta la concentración del agonista, tal como se ha descrito previamente para el receptor  $\alpha 7$  (Fatt, 1950; Katz & Thesleff, 1957). Esta disminución de los picos máximos al incrementar la concentración del agonista se relaciona con unas constantes de activación e inactivación más rápidas (Vea Tabla IV). Las constantes de activación e inactivación que hemos registrado para la respuesta  $\alpha 7$  pueden considerarse inusualmente lentas en comparación con las determinadas mediante otras técnicas que emplean sistemas de perfusión continuos. Asimismo, en el caso de la respuesta no- $\alpha 7$ , la obtención del pico máximo se ralentiza en el tiempo así como la caída de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  tras una aplicación continua de nicotina.

Este hecho impide el cálculo de la constante de activación e inactivación mediante esta técnica para las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  originadas por este subtipo de receptor. Nuestra explicación para estos resultados se relaciona con el sistema experimental que hemos empleado para medir dichas señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando medimos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en un lector de placas de fluorescencia, la inyección del agonista sobre la solución control que baña las células en el pocillo (ver materiales y métodos), hace que, por motivos de dilución, el agonista llegue más lentamente o de forma diferencial en el tiempo a todas las células del pocillo lo que hace que se ralentice la respuesta máxima (ver figura comportamiento de antagonistas), así como la desensibilización de los receptores. Otro dato que apoyaría esta explicación se denota en los experimentos en los que se bloquea la respuesta  $\alpha 7$ -modulada con el antagonista  $\alpha 7$  reversible, MLA (Fig.13), donde se puede observar cómo el bloqueo por MLA se va perdiendo a medida que aumenta el tiempo de registro.

Para poder visualizar mejor la desensibilización de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ , recurrimos a la técnica de las aequorinas. Esta técnica comparte la propiedad de realizar medidas en poblaciones celulares pero permite además realizar pulsos consecutivos de agonista, además de poder obtener datos cuantitativos sobre las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzadas. Cuando registramos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol con este nuevo sistema, observamos que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por receptores  $\alpha 7$  era significativamente más pequeña que la obtenida tras la activación de los receptores no- $\alpha 7$ . Asimismo, una segunda estimulación del nAChR  $\alpha 7$  produjo una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mucho menor que la primera, a diferencia de lo que ocurrió con la respuesta mediada por el nAChR no- $\alpha 7$ . Una de las posibles causas que puede contribuir a la rápida desensibilización del nAChR  $\alpha 7$  se relaciona con que la estimulación de este subtipo de receptor, según nuestros datos, está acoplada a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV de tipo no-L, mientras que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el nAChR no- $\alpha 7$  está acoplada a los CCVD del tipo L. Se sabe que los CCDV de tipo no-L se inactivan

más rápidamente por  $\text{Ca}^{2+}$  (Hernandez-Guijo *et al.*, 2001) y por voltaje que los no-L (Villarroya *et al.*, 1999), lo que se traduce en una disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y secreción de catecolaminas (Artalejo *et al.*, 1987; Alonso *et al.*, 1999). En conjunto, estos resultados muestran que el nAChR  $\alpha 7$  de la célula cromafín presenta una rápida desensibilización tal como se ha descrito para otros sistemas celulares (Couturier *et al.*, 1990).

El hecho de que a altas concentraciones de agonista se pierda su acción sobre el subtipo  $\alpha 7$  y activen el no- $\alpha 7$  puede también estar relacionado con el hecho de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV de subtipo L favorece la inhibición de los canales N y P/Q en células cromafines bovinas (Rosa *et al.*, 2009).

El acoplamiento diferencial de los CCVD tipo L y no-L tras la activación de los distintos subtipos de nAChR se corroboró mediante la utilización de N-metil glucamina y cadmio. La sustitución del  $\text{Na}^+$  extracelular por N-metil glutamina que impide la despolarización de la membrana plasmática originada por activación de los canales de  $\text{Na}^+$ , redujo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mismo porcentaje que  $\omega$ -conotoxin MVIIC para el  $\alpha 7$  y nimodipino para el no-  $\alpha 7$ . Este resultado se confirmó nuevamente al utilizar el cadmio, como bloqueante inespecífico de los CCDV que tampoco ofreció un mayor aumento del bloqueo de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por  $\omega$ -conotoxin MVIIC y nimodipino sobre los nAChR  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ , respectivamente. El acoplamiento entre nAChR  $\alpha 7$  y CCVD del tipo no-L no se ha descrito previamente, sin embargo si hay evidencias en la literatura a favor de un acoplamiento entre receptores  $\alpha 3\beta 4$  y CCVD del tipo L (Douglas, 1968; Cheek, 1991).

Además de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CCDV, la activación de ambos subtipos de nAChR produce una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático que contribuye en gran medida a los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En células PC12 (Dickinson *et al.*, 2007) se ha demostrado que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por estimulación del subtipo  $\alpha 7$  es fundamentalmente por un componente CICR y los CCDV no contribuyen

prácticamente a dicha señal. Sin embargo, en este mismo trabajo, muestran que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la estimulación del nAChR no- $\alpha 7$  se debe fundamentalmente a través de CCDV de tipo L, no contribuyendo el CICR en dicha señal (Dickinson *et al.*, 2007) Estos resultados contrastan con los que hemos obtenidos en células cromafines bovinas, que muestran que tanto el CICR como los CCVD contribuyen al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tanto tras la estimulación del subtipo  $\alpha 7$  como no- $\alpha 7$ ; la diferencia entre ambas respuestas reside en el subtipo de CCVD al que está acoplado cada nAChR.

Durante muchos años se ha considerado a la mitocondria como el orgánulo que restablece los incrementos altos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a niveles basales (Herrington *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997) con una posible función acumuladora de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo estímulos de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados obtenidos con aequorinas dirigidas a la mitocondria demuestran que esta organela se comporta como un sumidero de  $\text{Ca}^{2+}$  rápido y reversible, bajo estímulos como ACh,  $\text{K}^+$  o cafeína (Montero *et al.*, 2000; Montero *et al.*, 2001). También se ha descrito que la mitocondria es capaz de regular la secreción de catecolaminas (Montero *et al.*, 2000; Montero *et al.*, 2001) por su capacidad de aclarar el  $\text{Ca}^{2+}$  subplasmalemal. Cuando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico son menores de 4-5  $\mu\text{M}$ , la velocidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por la mitocondria es lenta en comparación con la velocidad de captación rápida para concentraciones mayores de 4-5  $\mu\text{M}$  (Montero *et al.*, 2001). En nuestras condiciones, la estimulación de los dos subtipos de nAChR, a concentraciones supramáximas de agonistas y modulador no llegan a superar esta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico límite. Por tanto, la mitocondria está captando y liberando el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico subplasmalemal por estimulación del  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  a una velocidad semejante.

Las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior mitocondrial muestran que este orgánulo capta de forma transitoria y rápida incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico de la misma manera para la estimulación producida por ambos subtipos de nAChR ya que las relaciones  $[\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_c$  para ambos receptores no son estadísticamente diferentes. Para indagar acerca de si la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior mitocondrial era igual para los dos subtipos de

nAChR, utilizamos el FCCP que es capaz de bloquear el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. La perfusión de FCCP solo produce aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos y mitocondriales lo que sugiere que este  $\text{Ca}^{2+}$  puede provenir tanto del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular como de un orgánulo intracelular reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se sabe que el FCCP tiene efectos adicionales (Tretter *et al.*, 1998) al de su capacidad de disipación del potencial de membrana mitocondrial, que pueden explicar ese aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por la perfusión de este compuesto. Nuestros resultados indican que el FCCP impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior mitocondrial y este efecto no influye de forma diferencial en las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por estimulación del subtipo  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$ .

Tanto la estimulación del nAChR  $\alpha 7$  como el no- $\alpha 7$  indujeron una liberación de catecolaminas. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el nAChR  $\alpha 7$  fue más eficiente para inducir la secreción que la mediada por el nAChR no- $\alpha 7$ . Sin embargo, la magnitud de la secreción de catecolaminas inducida por ambos nAChRs, a concentraciones supramáximas de agonistas y modulador, fue mayor para el no- $\alpha 7$ . La mayor eficiencia en la secreción asociada a la activación del nAChR  $\alpha 7$  no parece estar relacionada con los tránsitos de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ni por tanto, tampoco por una mayor producción de ATP (McCormack & Denton, 1990; Robb-Gaspers *et al.*, 1998) por activación de deshidrogenasas mitocondriales y respiración. Esta mayor eficiencia en la secreción de catecolaminas inducida por la activación de nAChR  $\alpha 7$  en comparación con el no- $\alpha 7$ , podría estar relacionada con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol por los CCDV de tipo no-L, los cuales parecen estar localizados más próximos a los lugares de exocitosis que los del tipo L (Lopez *et al.*, 1994; Lara *et al.*, 1998).

Aunque estudios anteriores (Campos-Caro *et al.*, 1997) mostraron que la BGT se une principalmente a células adrenérgicas en rodajas de adrenales bovinas, nosotros no hemos encontrado diferencias en cuanto a secreción diferencial de noradrenalina y adrenalina inducida por el nAChR  $\alpha 7$ -modulado. Una de las posibles explicaciones a esta observación puede ser que nosotros hemos utilizado células cromafines en cultivo, mientras que el estudio realizado por Criado y cols (Criado *et al.*, 1997) fue realizado en

rodajas de glándula adrenal bovina. Posiblemente, los procesos de digestión enzimática, aislamiento y cultivo pueda alterar el fenotipo.

Los resultados que hemos obtenido ponen de manifiesto que la célula cromafín bovina, además de tener nAChR heteroméricos  $\alpha 3\beta 4/\alpha 3\beta 4\alpha 5$ , contiene un nAChR  $\alpha 7$  capaz de generar señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación de catecolaminas cuando se encuentra ligado a un modulador alostérico, además de un agonista. Probablemente, en términos de medidas de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y secreción de catecolaminas, haya sido difícil determinar la función de este subtipo de receptor porque según nuestros resultados: (i) el receptor de células cromafines bovinas requiere de la presencia de un modulador alostérico y bajas concentraciones de agonistas para generar incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y secreción de catecolaminas, (ii) la magnitud de las señales de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inducidas por el nAChR  $\alpha 7$  son mucho menores que las no- $\alpha 7$  y (iii) es un receptor que se inactiva muy rápidamente.

El hecho que el nAChR  $\alpha 7$  de la célula cromafín, y seguramente de otras neuronas simpáticas, requiera de un modulador para incrementar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares nos hace pensar que pueda existir una o varias sustancias, que al liberarse ante determinados estímulos, puedan actuar como moduladores alostéricos  $\alpha 7$  positivos y así activar estos receptores para favorecer la liberación de neurotransmisores.

## **VI.2. NEUROPROTECCIÓN MEDIADA POR nAChR $\alpha 7$ y $\beta 2^*$ EN CÉLULAS SH-SY5Y LESIONADAS CON ÁCIDO OKADAICO**

Aunque hay estudios que implican a los receptores  $\beta 2^*$  en la protección mediada por nAChRs (Kihara *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2003), la mayoría apuntan al nAChR  $\alpha 7$  (Shimohama *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2004) y al  $\text{Ca}^{2+}$  (Dajas-Bailador *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2005) como responsables en dicho proceso. Dado que los datos que habíamos obtenido en células cromafines bovinas indicaban que la activación de los nAChR  $\alpha 7$  no generaba un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , salvo en presencia de un modulador alosterico (Fig. 10 y

11), pero la activación de los receptores no- $\alpha 7$  si la producían, decidimos abordar la pregunta de cómo la activación de los diferentes subtipos de nAChR podrían mediar neuroprotección en un modelo relacionado con la hiperfosforilación de  $\tau$ . A la hora de analizar el mecanismo neuroprotector, nos hemos centrado fundamentalmente en la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  y las vías de señalización intracelulares que mediaban dicha respuesta. Para ello hemos empleado células de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y que constituye un modelo neuronal ampliamente aceptado para estudios de muerte y protección celular. Asimismo, expresan nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  (Peng *et al.*, 1994; Gentry & Lukas, 2002), que son objeto de este estudio. Hemos elegido un modelo de toxicidad que estuviera relacionado con la patología de la enfermedad de EA, concretamente la hiperfosforilación de  $\tau$ ; esta situación la hemos inducido mediante la incubación de las células con AO.

Los primeros resultados que obtuvimos mostraron que tanto el agonista selectivo  $\alpha 7$  PNU282987 como el agonista selectivo  $\beta 2^*$  5IA85380 eran capaces de disminuir la muerte celular inducida por AO. Por tanto, estos resultados indicaban que ambos subtipos de nAChR podrían mediar o activar vías neuroprotectoras.

Una vez comprobada la protección con los agonistas nicotínicos, tuvimos curiosidad por averiguar si la modulación alostérica del receptor nAChR  $\alpha 7$  podría, también, mediar neuroprotección y/o activar vías de supervivencia. Este interés deriva del creciente desarrollo de nuevos moduladores alostéricos de los receptores nicotínicos como fármacos potencialmente útiles para tratar distintas enfermedades sistema nervioso central, entre las que se encuentran la esquizofrenia o la enfermedad de Alzheimer (Maelicke, 2000). Aunque, la eficacia clínica de estos moduladores alostéricos se basaría, fundamentalmente, en su capacidad para mejorar la neurotransmisión colinérgica, los resultados que hemos obtenido, al menos con el modulador PNU120596, parecen indicar que no presenta propiedades neuroprotectoras. Este resultado negativo nos ha llamado la atención porque estudios previos de nuestro grupo (Arias *et al.*, 2004; Arias *et al.*,

2005; Lorrio *et al.*, 2007) han demostrado que la galantamina, un inhibidor moderado de la acetilcolinesterasa y modulador alostérico positivo de los nAChR (Albuquerque *et al.*, 2001), sí ha protegido en unas condiciones experimentales muy parecidas a las que hemos empleado con el PNU 120595 (Arias *et al.*, 2005). Esta controversia, puede ser explicada por un mecanismo de actuación diferente del modulador PNU120596 sobre el receptor  $\alpha 7$  o por un efecto complementario al de modulador alostérico de galantamina. Con la idea de explorar cómo el  $\text{Ca}^{2+}$  podría estar implicado en el efecto protector mediado por PNU282987 y 5IA85380 y, al mismo tiempo, analizar la selectividad de estos agonistas sobre los distintos subtipos de nAChR, medimos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células SH-SY5Y cargadas con Fluo-4. Curiosamente, en el caso del agonista PNU282987, no conseguimos ver una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la concentración de agonista que produjo efecto protector. Sólo cuando las células estaban en presencia del modulador PNU120596, pudimos registrar un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y dicho incremento se bloqueó por completo por antagonistas selectivos  $\alpha 7$  (BGT y MLA) y, en menor medida, por mecamilamina. Estos resultados, que coincidían con los obtenidos en las células cromafines bovinas, indicaban que el agonista PNU282987, a las concentraciones que ofrecía protección, estaba actuando sobre un nAChR  $\alpha 7$ . En cuanto al por qué del menor bloqueo de la señal  $\alpha 7$ -modulada por mecamilamina, está descrito que este antagonista presenta una mayor afinidad por nAChR heteroméricos  $\alpha\beta$  que por los  $\alpha 7$  homoméricos (Chavez-Noriega *et al.*, 1997; Frazier *et al.*, 1998; Papke *et al.*, 2001); el que la mecamilamina bloqueará en menor medida las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por PNU282987+PNU120596 en comparación con las señales inducidas por el 5IA85380, sugiere que ambos PNU estarían actuando mayoritariamente sobre un receptor homomérico  $\alpha 7$ .

A diferencia del PNU282987, el agonista 5IA85380 sí fue capaz de aumentar por sí solo los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos a la concentración que mostró ser protector. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas 5IA85380 se bloquearon por antagonistas selectivos  $\beta 2^*$  como



DH $\beta$ E y  $\alpha$ -conotoxina MII pero no por antagonistas  $\alpha 7$  (BGT) o  $\alpha 3\beta 4$  ( $\alpha$ -conotoxina AulB), lo que corrobora su selectividad sobre los nAChR del subtipo  $\beta 2^*$  (Dickinson *et al.*, 2007).

En cuanto a la tiempo dependencia del efecto protector, hemos observado que las protecciones empiezan a los 5 minutos de incubación de los agonistas pero a partir de 1-4 h de incubación las protecciones son máximas. Estos tiempos parecen ser los necesarios para activar la vías de señalización intracelulares que mitigarán la lesión ocasionada por AO aunque el agonista ya no este presente durante las siguientes 44 ó 47 h posteriores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por el grupo con el agonista nicotínico epibatidina en un modelo de estrés oxidativo (Egea *et al.*, 2007). Dado que las corrientes nicotínicas se caracterizan por su rápida desensibilización (Lopez *et al.*, 1998; Gonzalez-Rubio *et al.*, 2006), el que el agonista necesite estar presente más de 5 minutos para activar las vías neuroprotectoras, sugiere que este proceso se produce aunque el receptor esté desensibilizado. En este sentido, hay estudios que sugieren que la desensibilización del nAChR es la causa de la protección mediada por agonistas nicotínicos (Egea *et al.*, 2006; Buccafusco *et al.*, 2009a). Otros estudios muestran que los antagonistas  $\alpha 7$  también pueden mediar protección (Ferchmin *et al.*, 2003; Escubedo *et al.*, 2009), sugiriendo que éstos ejercen un efecto similar al del estado desensibilizado al que achacan como responsable del efecto neuroprotector.

Que el agonista  $\alpha 7$  PNU282987 ejerciera su efecto protector sin inducir aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico está en contra de la creencia de que el  $\text{Ca}^{2+}$  es el segundo mensajero responsable de la activación de cinasas intracelulares implicadas en la neuroprotección mediada por nAChR  $\alpha 7$  (Donnelly-Roberts *et al.*, 1996; Dajas-Bailador *et al.*, 2000; Ferchmin *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando estudiamos los efectos protectores del PNU282987 en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$ , pudimos corroborar que el efecto protector se mantenía. En el caso del 5IA85380, su efecto protector se perdió cuando se incubó en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Por tanto, la protección mediada por el nAChR $\alpha 7$  parece

ser  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente mientras que la mediada por nAChRs  $\beta 2^*$  parece depender del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Con la idea de determinar si el  $\text{Ca}^{2+}$  que accede a la célula por el receptor  $\alpha 7$  sería capaz de mediar una señal protectora, incubamos las células con el agonista  $\alpha 7$  y su modulador alostérico el PNU120596. Empleamos esta combinación porque cuando medimos las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, vimos que la combinación de ambos PNU inducía un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  que se inhibía por completo por BGT o MLA. Curiosamente, cuando incubamos el agonista  $\alpha 7$  con su modulador, la protección que observamos con el agonista  $\alpha 7$  se perdió. Se sabe que el PNU120596 es un modulador alostérico de tipo II (Gronlien *et al.*, 2007); que al unirse al nAChR  $\alpha 7$  ocasiona un cambio conformacional del receptor (Barron *et al.*, 2009), lo activa en su estado desensibilizado (Gronlien *et al.*, 2007) e induce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pensamos que puede haber varias interpretaciones para explicar el por qué el modulador puede estar anulando el efecto del agonista  $\alpha 7$ . Una de las explicaciones podría ser que la propia entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación del  $\alpha 7$  cause cierta toxicidad, de hecho existen resultados que muestran que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la activación del subtipo  $\alpha 7$  puede llegar a ser tóxica (Li *et al.*, 1999). Sin embargo, un estudio reciente muestra que tanto moduladores de tipo I como II, entre los cuales está el PNU120596, en combinación con agonistas nicotínicos no inducen toxicidad en células PC12 ni en neuronas corticales de rata (Hu *et al.*, 2009). Otra posible explicación es que un cambio conformacional del receptor, inducido por la unión del modulador alostérico, podría impedir la desensibilización o activación de la señal protectora mediada por el nAChR  $\alpha 7$ .

En cuanto a las vías de señalización intracelulares implicadas en el mecanismo neuroprotector asociadas a la activación de nAChR, son varias las cinasas intracelulares que se han implicado en dicho proceso (Buckingham *et al.*, 2009), de ahí que nos propusimos estudiar cuales de ellas podrían estar implicadas en mecanismo neuroprotector mediado por PNU282987 ( $\alpha 7$ ) y 5IA85380 ( $\beta 2^*$ ).

En el caso del nAChR  $\alpha 7$ , es conocido que JAK-2 es una cinasa que se fosforila a sí misma, activándose. Además JAK-2 se une a la subunidad  $\alpha 7$  en presencia de agonistas nicotínicos (Shaw *et al.*, 2002) y se puede activar de forma  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente (Chernyavsky *et al.*, 2009). Los resultados de este trabajo muestran que únicamente la estimulación del nAChR  $\alpha 7$  y no la del  $\beta 2^*$  produjo un aumento de la fosforilación de JAK-2. La implicación de esta cinasa en la protección mediada por el agonista  $\alpha 7$  se confirmó cuando la incubación de las células con un inhibidor de la JAK-2, el AG-490, revirtió el efecto protector de PNU282987, pero no el del 5IA85380. Resultados similares se han descrito en células PC12 y neuronas, en las que se ha implicado a JAK-2 en la protección mediada por nAChR  $\alpha 7$  frente la lesión inducida por  $\text{A}\beta_{1-42}$  (Kihara *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002). En el caso de los nAChR  $\beta 2^*$ , podemos concluir que JAK-2 no se activa por esta vía.

Volviendo al tema del por qué el agonista pierde su capacidad protectora en presencia del modulador alostérico. Hemos encontrado que la cinasa JAK-2 no se fosforila cuando el agonista está en presencia del modulador. Por tanto, pensamos que el modulador podría estar ocasionando un cambio conformacional del receptor que impediría la activación de JAK-2 o que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del subtipo  $\alpha 7$  impediría la fosforilación de esta cinasa.

Continuando con las vías de señalización intracelulares, son ya muchos los datos de otros grupos (Quesada *et al.*, 2008; Buckingham *et al.*, 2009) y del nuestro (Arias *et al.*, 2005; Canas *et al.*, 2007) que demuestran que la activación de la vía PI3K/Akt está relacionada con fenómenos de supervivencia. En relación a esta vía, hemos visto que tanto el PNU282987 como el 5IA85380 pueden aumentar la fosforilación la proteína Akt. Además, tanto el efecto protector del agonista  $\alpha 7$  como  $\beta 2^*$  se perdió cuando se co-incubaron con un antagonista de esta vía, el LY294002. Por tanto, esta vía de señalización es compartida por ambos subtipos de nAChR. En el caso del receptor  $\alpha 7$ , se ha descrito que una de las dianas de fosforilación de JAK-2 es precisamente la ruta

PI3K/Akt (Shaw *et al.*, 2002). La activación de PI3K puede darse de forma  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente o independiente a través de la activación de JAK-2 (Chernyavsky *et al.*, 2009).

Basándonos en que hay antecedentes bibliográficos que muestran que los nAChRs son capaces de activar la vía MAPK/ERK de una forma  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente (Chang & Berg, 2001; Nakayama *et al.*, 2001; Dajas-Bailador *et al.*, 2002a) y, que también esta vía puede activarse por nAChR  $\alpha 7$  (Nakayama *et al.*, 2001) decidimos determinar si el PNU282987 y el 5IA85380 podrían inducir la fosforilación de ERK 1/2. En nuestras condiciones experimentales, hemos observado que la activación de ERK 1/2 solo se induce por 5IA85380. Asimismo, la protección ofrecida por el 5IA85380 también fue dependiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  extracelular ya que en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la protección se perdió. Otro dato que apoya la participación de esta vía en el mecanismo protector del 5IA85380, es que el antagonista PD 98059 bloquea su efecto protector. A diferencia de lo observado con el agonista  $\beta 2^*$ , la activación del nAChR  $\alpha 7$  con PNU282987 no activó la ruta de MEK/ERK1/2, por tanto, su mecanismo protector parece ser independiente de estas cinasas.

Dado que ambos agonistas activaban Akt, intentamos buscar cinasas que fueran activadas por Akt y que podrían estar relacionadas con el mecanismo de acción de nuestro tóxico, el AO, que induce hiperfosforilación de  $\tau$ . Una de las cinasas que fosforila  $\tau$  es la GSK-3 $\beta$  (Grimes & Jope, 2001), y se sabe que P-Akt inactiva GSK-3 $\beta$  mediante la fosforilación de su residuo Ser-9 (Cross *et al.*, 1995; Srivastava & Pandey, 1998). Lo que hemos observado es que los agonistas nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  producen una fosforilación de Ser-9-GSK-3 $\beta$  a los 15 minutos de incubación de los mismos. Sin embargo, el estado fosforilado de la Ser-9 disminuyó a las 24 horas, lo que descartaría que la inactivación de la GSK-3 $\beta$  prolongada en el tiempo sea la causa última del efecto protector frente al AO.

Sin embargo, la protección mediada por ambos subtipos de nAChR parece estar relacionada con la inhibición de GSK-3 $\beta$ , ya que cuando combinamos el AR-A014418 (un

inhibidor de GSK-3 $\beta$ ) con cada uno de los agonistas nicotínicos, no observamos un mayor efecto protector. Por tanto, estos resultados sugieren que la inhibición de GSK-3 $\beta$  está relacionada con el efecto protector mediado a través de nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  frente a AO.

En otra serie de experimentos, lo que hicimos fue evaluar cómo el estímulo tóxico modificaba GSK-3 $\beta$  y si los agonistas  $\alpha 7$  y/o  $\beta 2^*$  podrían cambiar dicho patrón. Lo primero que observamos fue que el tratamiento de las células SH-SY5Y durante 24 h con AO aumenta la fosforilación de la Ser-9-GSK-3 $\beta$ . Este efecto, que inicialmente podría ser contradictorio, también se ha descrito por otros grupos (Qian *et al.*, 2009). Pensamos que el aumento de GSK-3 $\beta$  inactivada podría explicarse en base a que la inhibición de la actividad de la PP2A por el tratamiento con AO (Tanaka *et al.*, 1998; Bennechib *et al.*, 2000), aumenta la fosforilación de la Ser-9 de GSK-3 $\beta$  (Qian *et al.*, 2009).

En estas condiciones experimentales, los agonistas  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$ , así como el inhibidor de GSK-3 $\beta$ , el AR-A014418, no modificaron el estado de fosforilación de la Ser-9 respecto a la GSK-3 $\beta$  total. Por tanto estos resultados apoyarían la idea de que el efecto protector ofrecido por estos compuestos no implica, en última instancia, la inactivación mantenida de la enzima GSK-3 $\beta$  por fosforilación de su Ser-9.

En cuanto a los niveles de Tyr-216 fosforilada de GSK-3 $\beta$  (forma activa), ésta no se modificó por el tóxico solo ni en combinación con los agonistas nicotínicos. Estos datos difieren de los obtenidos en un estudio previo en el que muestran un aumento de este residuo fosforilado en presencia de A $\beta_{1-42}$  (Hu *et al.*, 2008). Esta discrepancia de resultados podría ser debida a que en este último estudio cuantifican la P-Tyr216 GSK-3 $\beta$  con respecto a la proteína  $\tau$  total en vez de respecto a GSK-3 $\beta$  total, como hemos hecho en este estudio.

Curiosamente, cuando analizamos la cantidad de GSK-3 $\beta$  total descubrimos que el AO la aumenta a casi el doble con respecto al basal. Como hemos dicho anteriormente, la Ser-9 de GSK-3 $\beta$  también está aumentada en células con AO casi al

doble. Esto haría que, en términos relativos, la actividad de GSK-3 $\beta$  no se viera modificada con respecto a la situación control como se ha demostrado en estudios previos en células SH-SY5Y tratadas con AO (Tanaka *et al.*, 1998; Bennechib *et al.*, 2000). El aumento de la GSK-3 $\beta$  se ha descrito con anterioridad en células gliales progenitoras de pacientes de Alzheimer tratadas con A $\beta$  (He & Shen, 2009) así como en cerebros postmortem procedentes de enfermos de Alzheimer (Lau *et al.*, 1999). En realidad, existen modelos transgénicos que sobre-expresan la proteína GSK-3 $\beta$  y reproducen muchas características fisiopatológicas de esta enfermedad (Engel *et al.*, 2006). Por tanto, el AO parece inducir incrementos de GSK-3 $\beta$  que asemejarían lo que sucede en los pacientes de EA.

Por tanto, pensamos que la reducción de la GSK-3 $\beta$  total ocasionada por los agonistas nicotínicos y el inhibidor de GSK-3 $\beta$  en células tratadas con AO parece estar implicada en el mecanismo protector mediado por agonistas nicotínicos.

Cuando combinamos los agonistas nicotínicos con el AR-A014418 no obtuvimos un efecto protector aditivo. Estos resultados sugieren que una inhibición previa de la enzima GSK-3 $\beta$ , ya sea con los agonistas nicotínicos o con el inhibidor de GSK-3 $\beta$ , puede ser responsable de la reducción de GSK-3 $\beta$  total en células tratadas con OA. Estudios recientes demuestran que el litio (inhibidor de GSK-3 $\beta$ ) y extractos de tabaco son capaces de reducir los niveles de mRNA y proteína GSK-3 $\beta$  respectivamente (Mendes *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009).

La enzima GSK-3 $\beta$  fosforila específicamente el residuo Ser 396/404 de la proteína  $\tau$  (PHF-1, Paired Helicoidal Filament-1) tanto en cultivos celulares (Lovestone *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1998) como en modelos *in vivo* (Spittaels *et al.*, 2000). La hiperfosforilación de  $\tau$  por inhibición de PP2A induce una desestructuración de los microtúbulos que causa muerte celular en células SH-SY5Y tratadas con AO (Tanaka *et al.*, 1998). Esta desestabilización de los microtúbulos llega a comprometer el transporte axonal, produciéndose una neurodegeneración en aquellas neuronas con ovillos

neurofibrilares que son características en los cerebros de pacientes de EA (Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1997). En nuestras condiciones experimentales también hemos visto que el AO prácticamente duplica la fosforilación de Ser 396/404 pero este resultado no parece ser debido a un aumento de la actividad de GSK-3 $\beta$  sino a la inhibición de las fosfatasas que defosforilan  $\tau$ . Sin embargo, tanto el agonista  $\alpha 7$ ,  $\beta 2^*$  como el inhibidor AR-AO14418 producen una disminución en la expresión de GSK-3 $\beta$  que, consecuentemente, hace que disminuya la hiperfosforilación de  $\tau$  en la Ser 396/404. Aún cuando hay estudios previos que muestran que algunos compuestos como el litio, otro inhibidor de GSK-3 $\beta$ , puede prevenir la fosforilación de  $\tau$  en PHF1 y Tau1 inducido por A $\beta$  (Alvarez *et al.*, 1999), la prevención de la hiperfosforilación de  $\tau$  en su residuo Ser 396/404 con agonistas nicotínicos aún no ha sido descrita.

Como conclusión final podemos decir que, aun cuando la activación de nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  pueden mediar protección frente AO, los mecanismos implicados son distintos. La protección mediada por el nAChR  $\alpha 7$  implica la activación de vía de señalización JAK-2/PI3K/Akt de forma Ca<sup>2+</sup>-independiente. En el caso del nAChR  $\beta 2^*$  su mecanismo protector se relaciona con la activación de PI3K/Akt y MEK/ERK1/2 por un mecanismo Ca<sup>2+</sup>-dependiente.

Sin embargo, ambas vías de señalización convergen en la inactivación transitoria de GSK-3 $\beta$ . La inactivación de GSK-3 $\beta$  previa y transitoria al estímulo tóxico está implicada en la disminución de los aumentos de expresión de esta enzima tras su incubación con un inductor de hiperfosforilación de  $\tau$ . Además, la disminución de la fosforilación en Ser 396/405 de  $\tau$  se produce tras la activación de los nAChR  $\alpha 7$  y  $\beta 2^*$  y por inhibición de GSK-3 $\beta$  previa al tratamiento con OA. Por tanto, tanto la intervención sobre nAChR  $\alpha 7$  como  $\beta 2^*$  podrían ser eficaces para reducir la hiperfosforilación de  $\tau$  y la aparición de ovillos neurofibrilares característicos de los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

## VII. CONCLUSIONES

**I.- En relación a cómo los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  pueden regular los niveles de calcio intracelular y la secreción de catecolaminas en células cromafines bovinas, las conclusiones han sido:**

1. El receptor nicotínico  $\alpha 7$  de la célula cromafín bovina (CCB) requiere la presencia de un modulador alostérico para generar incrementos del calcio citosólico y secreción de catecolaminas. Sin embargo, la activación de los receptores nicotínicos no- $\alpha 7$  no requiere de la presencia de un modulador alostérico para inducir señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y secreción de catecolaminas.
2. El receptor nicotínico  $\alpha 7$  de la CCB se desensibiliza rápidamente.
3. El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inducido por nAChR no- $\alpha 7$  se encuentra acoplado a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por CCDV de tipo L, mientras que el mediado por el receptor  $\alpha 7$ -modulado está acoplado a CCDV de tipo no-L.
4. Tanto el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  asociado al receptor nicotínico modulado- $\alpha 7$  como al no- $\alpha 7$  están acoplados a CICR.
5. La estimulación del nAChR modulado- $\alpha 7$  y del no- $\alpha 7$  inducen liberación de catecolaminas. Sin embargo, la secreción inducida tras la activación del nAChR modulado- $\alpha 7$  parece ser más eficiente que la asociada a receptores no- $\alpha 7$  en términos de relación  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  /liberación de catecolaminas.

**II.- En relación a la contribución de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y no- $\alpha 7$  a la protección de las células SH-SY5Y lesionadas por hiperfosforilación de tau, podemos extraer las siguientes conclusiones:**

1. Los agonistas nicotínicos selectivos  $\alpha 7$  y  $\beta 2$  (PNU282987 y 5IA85380) protegen frente a la toxicidad inducida por ácido okadaico.
2. Las concentraciones protectoras del agonista  $\alpha 7$  no median incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  pero si las del agonista  $\beta 2^*$ . Asimismo la protección mediada por receptores  $\alpha 7$  es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que la protección mediada por receptores  $\beta 2^*$  si lo es.
3. La presencia de un modulador alostérico  $\alpha 7$  junto al agonista  $\alpha 7$  induce un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a BGT. Sin embargo, la protección que ofrece en



agonista  $\alpha 7$  se pierde en presencia del modulador alostérico. Tampoco el modulador alostérico *per sé* ofreció protección.

4. La cinasa iniciadora implicada en la protección mediada por el receptor  $\alpha 7$  es la JAK-2 ( $\text{Ca}^{2+}$ -independiente). ERK1/2 ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente) está implicada en la protección mediada por receptores  $\beta 2^*$ . Tanto la activación del subtipo  $\alpha 7$  como la no- $\alpha 7$  activan la ruta de supervivencia PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ .
5. Tanto el PNU282987 como el 5IA85380 ocasionan una inactivación transitoria de GSK-3 $\beta$ .
6. El ácido okadaico incrementa los niveles de expresión de GSK-3 $\beta$ , estos niveles se redujeron significativamente tanto por el agonista  $\alpha 7$  como  $\beta 2^*$ . Sin embargo, la fosforilación en los residuos de GSK-3 $\beta$  que determinan su activación o inactivación, no se vieron modificados por ninguno de los agonistas nicotínicos.
7. En última instancia, tanto el agonista  $\alpha 7$  como el  $\beta 2^*$  disminuyeron la hiperfosforilación de  $\tau$  en su residuo específico para GSK-3 $\beta$  y, por tanto, la lesión ocasionada por ácido okadaico.

Como conclusión global cabe resaltar que el esclarecimiento de la funcionalidad y los mecanismos protectores de los receptores nicotínicos estudiados aquí, permitirán la identificación de nuevas dianas moleculares para el diseño, síntesis y desarrollo de nuevos compuestos neuroprotectores con potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer, objetivo principal del Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, de la Universidad Autónoma de Madrid.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

AFAR, R., TRIFARO, J. M. & QUIK, M. (1994). Nicotine-induced intracellular calcium changes are not antagonized by alpha-bungarotoxin in adrenal medullary cells. *Brain Res* **641**, 127-131.

AGUGLIA, E., ONOR, M. L., SAINA, M. & MASO, E. (2004). An open-label, comparative study of rivastigmine, donepezil and galantamine in a real-world setting. *Curr Med Res Opin* **20**, 1747-1752.

ALBUQUERQUE, E. X., PEREIRA, E. F., ALKONDON, M. & ROGERS, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89**, 73-120.

ALBUQUERQUE, E. X., PEREIRA, E. F., BONFANTE-CABARCAS, R., MARCHIORO, M., MATSUBAYASHI, H., ALKONDON, M. & MAELICKE, A. (1996). Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: cell compartment-specific expression and modulatory control of channel activity. *Prog Brain Res* **109**, 111-124.

ALBUQUERQUE, E. X., SANTOS, M. D., ALKONDON, M., PEREIRA, E. F. & MAELICKE, A. (2001). Modulation of nicotinic receptor activity in the central nervous system: a novel approach to the treatment of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **15 Suppl 1**, S19-25.

ALKONDON, M., PEREIRA, E. F., CORTES, W. S., MAELICKE, A. & ALBUQUERQUE, E. X. (1997). Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* **9**, 2734-2742.

ALMAZAN, G., AUNIS, D., GARCIA, A. G., MONTIEL, C., NICOLAS, G. P. & SANCHEZ-GARCIA, P. (1984). Effects of collagenase on the release of [3H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells. *Br J Pharmacol* **81**, 599-610.

ALONSO, A. C., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5562-5566.

ALONSO, A. D., GRUNDKE-IQBAL, I., BARRA, H. S. & IQBAL, K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 298-303.

ALONSO, M. T., BARRERO, M. J., MICHELENA, P., CARNICERO, E., CUCHILLO, I., GARCIA, A. G., GARCIA-SANCHO, J., MONTERO, M. & ALVAREZ, J. (1999). Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* **144**, 241-254.

ALVAREZ, G., MUNOZ-MONTANO, J. R., SATRUSTEGUI, J., AVILA, J., BOGONEZ, E. & DIAZ-NIDO, J. (1999). Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* **453**, 260-264.

AMENTA, F., PARNETTI, L., GALLAI, V. & WALLIN, A. (2001). Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mech Ageing Dev* **122**, 2025-2040.

ARIAS, E., ALES, E., GABILAN, N. H., CANO-ABAD, M. F., VILLARROYA, M., GARCIA, A. G. & LOPEZ, M. G. (2004). Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **46**, 103-114.

ARIAS, E., GALLEGOS-SANDIN, S., VILLARROYA, M., GARCIA, A. G. & LOPEZ, M. G. (2005). Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1346-1353.

ARIOKA, M., TSUKAMOTO, M., ISHIGURO, K., KATO, R., SATO, K., IMAHORI, K. & UCHIDA, T. (1993). Tau protein kinase II is involved in the regulation of the normal phosphorylation state of tau protein. *J Neurochem* **60**, 461-468.

ARTALEJO, C. R., GARCIA, A. G. & AUNIS, D. (1987). Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium, and barium fluxes. *J Biol Chem* **262**, 915-926.

AVILA, J. (2000). Tau aggregation into fibrillar polymers: tauopathies. *FEBS Lett* **476**, 89-92.

BARBARA, J. G. & TAKEDA, K. (1996). Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9905-9909.

BARRANTES, G. E., ROGERS, A. T., LINDSTROM, J. & WONNACOTT, S. (1995). alpha-Bungarotoxin binding sites in rat hippocampal and cortical cultures: initial characterisation, colocalisation with alpha 7 subunits and up-regulation by chronic nicotine treatment. *Brain Res* **672**, 228-236.

BARRERO, M. J., MONTERO, M. & ALVAREZ, J. (1997). Dynamics of [Ca<sup>2+</sup>] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *J Biol Chem* **272**, 27694-27699.

BARRON, S. C., MCLAUGHLIN, J. T., SEE, J. A., RICHARDS, V. L. & ROSENBERG, R. L. (2009). An allosteric modulator of alpha7 nicotinic receptors, N-(5-Chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea (PNU-120596), causes conformational changes in the extracellular ligand binding domain similar to those caused by acetylcholine. *Mol Pharmacol* **76**, 253-263.

BARTUS, R. T., DEAN, R. L., 3RD, BEER, B. & LIPPA, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414.

BELLUARDO, N., MUDO, G., BLUM, M., AMATO, G. & FUXE, K. (2000). Neurotrophic effects of central nicotinic receptor activation. *J Neural Transm Suppl*, 227-245.

BENNECIB, M., GONG, C. X., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (2000). Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett* **485**, 87-93.

BERTRAND, D., GALZI, J. L., DEVILLERS-THIERY, A., BERTRAND, S. & CHANGEUX, J. P. (1993). Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6971-6975.

BIEDLER, J. L., HELSON, L. & SPENGLER, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**, 2643-2652.

BINDER, L. I., FRANKFURTER, A. & REBHUN, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**, 1371-1378.

BITNER, R. S., NIKKEL, A. L., MARKOSYAN, S., OTTE, S., PUTTFARCKEN, P. & GOPALAKRISHNAN, M. (2009). Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3beta and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Res* **1265**, 65-74.

BODNAR, A. L., CORTES-BURGOS, L. A., COOK, K. K., DINH, D. M., GROPP, V. E., HAJOS, M., HIGDON, N. R., HOFFMANN, W. E., HURST, R. S., MYERS, J. K., ROGERS, B. N., WALL, T. M., WOLFE, M. L. & WONG, E. (2005). Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* **48**, 905-908.

BOYD, N. D. (1987). Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC12 cells. *J Physiol* **389**, 45-67.

BRANDT, B. L., HAGIWARA, S., KIDOKORO, Y. & MIYAZAKI, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* **263**, 417-439.

BUCCAFUSCO, J. J., BEACH, J. W. & TERRY, A. V., JR. (2009a). Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *J Pharmacol Exp Ther* **328**, 364-370.

BUCCAFUSCO, J. J., WEBSTER, S. J., TERRY, A. V., JR., KILLE, N. & BLESSING, D. (2009b). Protracted cognitive effects produced by clonidine in Macaca nemestrina performing a delayed matching task. *Psychopharmacology (Berl)* **202**, 477-485.

BUCKINGHAM, S. D., JONES, A. K., BROWN, L. A. & SATTELLE, D. B. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* **61**, 39-61.

BURGHAS, L., SCHUTZ, U., KREMPPEL, U., DE VOS, R. A., JANSEN STEUR, E. N., WEVERS, A., LINDSTROM, J. & SCHRODER, H. (2000). Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res Mol Brain Res* **76**, 385-388.

BUSCIGLIO, J., LORENZO, A., YEH, J. & YANKNER, B. A. (1995). beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* **14**, 879-888.

CAAMANO, J., GOMEZ, M. J., FRANCO, A. & CACABELOS, R. (1994). Effects of CDP-choline on cognition and cerebral hemodynamics in patients with Alzheimer's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **16**, 211-218.

CAIRNS, N. J., LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. (2004). The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. *J Pathol* **204**, 438-449.

CAMPOS-CARO, A., SMILLIE, F. I., DOMINGUEZ DEL TORO, E., ROVIRA, J. C., VICENTE-AGULLO, F., CHAPULI, J., JUIZ, J. M., SALA, S., SALA, F., BALLESTA, J. J. & CRIADO, M. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem* **68**, 488-497.

CANAS, N., VALERO, T., VILLARROYA, M., MONTELL, E., VERGES, J., GARCIA, A. G. & LOPEZ, M. G. (2007). Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 946-953.

CONTI-FINE, B. M., NAVANEETHAM, D., LEI, S. & MAUS, A. D. (2000). Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol* **393**, 279-294.

COOPER, E., COUTURIER, S. & BALLIVET, M. (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**, 235-238.

CORBIN, J., METHOT, N., WANG, H. H., BAENZIGER, J. E. & BLANTON, M. P. (1998). Secondary structure analysis of individual transmembrane segments of the nicotinic acetylcholine receptor by circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biol Chem* **273**, 771-777.

COUTURIER, S., BERTRAND, D., MATTER, J. M., HERNANDEZ, M. C., BERTRAND, S., MILLAR, N., VALERA, S., BARKAS, T. & BALLIVET, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha 7$ ) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by  $\alpha$ -BTX. *Neuron* **5**, 847-856.

COYLE, J. T., PRICE, D. L. & DELONG, M. R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219**, 1184-1190.

CRIADO, M., ALAMO, L. & NAVARRO, A. (1992). Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res* **17**, 281-287.

CRIADO, M., DOMINGUEZ DEL TORO, E., CARRASCO-SERRANO, C., SMILLIE, F. I., JUIZ, J. M., VINIEGRA, S. & BALLESTA, J. J. (1997). Differential expression of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci* **17**, 6554-6564.

CROSS, D. A., ALESSI, D. R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M. & HEMMINGS, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789.

CRUNELLE, C. L., MILLER, M. L., BOOIJ, J. & VAN DEN BRINK, W. The nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline and the treatment of drug dependence: a review. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**, 69-79.

CUMMINGS, J. L. (2004). Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches. *Rev Neurol Dis* **1**, 60-69.

CHANG, K. T. & BERG, D. K. (2001). Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron* **32**, 855-865.

CHAVEZ-NORIEGA, L. E., CRONA, J. H., WASHBURN, M. S., URRUTIA, A., ELLIOTT, K. J. & JOHNSON, E. C. (1997). Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 2 \beta 2$ ,  $\alpha 2 \beta 4$ ,  $\alpha 3 \beta 2$ ,  $\alpha 3 \beta 4$ ,  $\alpha 4 \beta 2$ ,  $\alpha 4 \beta 4$  and  $\alpha 7$  expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 346-356.

CHEEK, T. R. (1991). Calcium regulation and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 199-205.

CHERNYAVSKY, A. I., ARREDONDO, J., QIAN, J., GALITOVSKIY, V. & GRANDO, S. A. (2009). Coupling of ionic events to protein kinase signaling cascades upon activation of  $\alpha 7$  nicotinic receptor: cooperative regulation of  $\alpha 2$ -integrin expression and Rho kinase activity. *J Biol Chem* **284**, 22140-22148.

CHO, J. H. & JOHNSON, G. V. (2004). Glycogen synthase kinase 3  $\beta$  induces caspase-cleaved tau aggregation in situ. *J Biol Chem* **279**, 54716-54723.

D'ANDREA, M. R. & NAGELE, R. G. (2006). Targeting the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Curr Pharm Des* **12**, 677-684.

DAJAS-BAILADOR, F. & WONNACOTT, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 317-324.

DAJAS-BAILADOR, F. A., LIMA, P. A. & WONNACOTT, S. (2000). The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent mechanism. *Neuropharmacology* **39**, 2799-2807.

DAJAS-BAILADOR, F. A., MOGG, A. J. & WONNACOTT, S. (2002a). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *J Neurochem* **81**, 606-614.

DAJAS-BAILADOR, F. A., SOLIAKOV, L. & WONNACOTT, S. (2002b). Nicotine activates the extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and protein kinase A, in SH-SY5Y cells and hippocampal neurones. *J Neurochem* **80**, 520-530.

DE JESUS MORENO MORENO, M. (2003). Cognitive improvement in mild to moderate Alzheimer's dementia after treatment with the acetylcholine precursor choline alfoscerate: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin Ther* **25**, 178-193.

DICKINSON, J. A., HANROTT, K. E., MOK, M. H., KEW, J. N. & WONNACOTT, S. (2007). Differential coupling of  $\alpha 7$  and non- $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J Neurochem* **100**, 1089-1096.

DONNELLY-ROBERTS, D. L., XUE, I. C., ARNERIC, S. P. & SULLIVAN, J. P. (1996). In vitro neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418. *Brain Res* **719**, 36-44.

DOUGLAS, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* **34**, 451-474.

DOUGLAS, W. W. & RUBIN, R. P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* **159**, 40-57.

DREWES, G., LICHTENBERG-KRAAG, B., DORING, F., MANDELKOW, E. M., BIERNAT, J., GORIS, J., DOREE, M. & MANDELKOW, E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J* **11**, 2131-2138.

EFTHIMIOPOULOS, S., VASSILACOPOULOU, D., RIPELLINO, J. A., TEZAPSIDIS, N. & ROBAKIS, N. K. (1996). Cholinergic agonists stimulate secretion of soluble full-length amyloid precursor protein in neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8046-8050.

EGEA, J., HERNANDEZ-GUIJO, J. M., OLIVARES, R., LOPEZ, M. G. & GARCIA, A. G. (2006). Desensitized nicotinic receptors that, however, afford cytoprotection in bovine chromaffin cells. *J Mol Neurosci* **30**, 59-60.

EGEA, J., ROSA, A. O., CUADRADO, A., GARCIA, A. G. & LOPEZ, M. G. (2007). Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* **102**, 1842-1852.

EL-HAJJ, R. A., MCKAY, S. B. & MCKAY, D. B. (2007). Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors. *Life Sci* **81**, 1317-1322.

ENGEL, T., HERNANDEZ, F., AVILA, J. & LUCAS, J. J. (2006). Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* **26**, 5083-5090.

ESCUBEDO, E., CAMARASA, J., CHIPANA, C., GARCIA-RATES, S. & PUBILL, D. (2009). Involvement of nicotinic receptors in methamphetamine- and MDMA-induced neurotoxicity: pharmacological implications. *Int Rev Neurobiol* **88**, 121-166.

FATT, P. (1950). The electromotive action of acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* **111**, 408-422.

FENWICK, E. M., MARTY, A. & NEHER, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **331**, 599-635.

FERCHMIN, P. A., PEREZ, D., ETEROVIC, V. A. & DE VELLIS, J. (2003). Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 1071-1078.

FERRARI, A., HOERNDLI, F., BAECHI, T., NITSCH, R. M. & GOTZ, J. (2003). beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem* **278**, 40162-40168.

FERRI, C. P., PRINCE, M., BRAYNE, C., BRODATY, H., FRATIGLIONI, L., GANGULI, M., HALL, K., HASEGAWA, K., HENDRIE, H., HUANG, Y., JORM, A., MATHERS, C., MENEZES, P. R., RIMMER, E. & SCAZUFCA, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**, 2112-2117.

FRANKE, T. F., KAPLAN, D. R., CANTLEY, L. C. & TOKER, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668.

FRAZIER, C. J., ROLLINS, Y. D., BREESE, C. R., LEONARD, S., FREEDMAN, R. & DUNWIDDIE, T. V. (1998). Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic

current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci* **18**, 1187-1195.

FREE, R. B. & MCKAY, D. B. (2003). Surface and intracellular nicotinic receptors expressed in intact adrenal chromaffin cells: direct measurements using [3H]epibatidine. *Brain Res* **974**, 60-69.

FUCILE, S. (2004). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* **35**, 1-8.

FUCILE, S., RENZI, M., LAX, P. & EUSEBI, F. (2003). Fractional Ca(2+) current through human neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* **34**, 205-209.

FUCILE, S., SUCAPANE, A. & EUSEBI, F. (2005). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors from rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* **565**, 219-228.

FUJITA, T. (1977). Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn* **40 Suppl**, 1-12.

GARCIA-GUZMAN, M., SALA, F., SALA, S., CAMPOS-CARO, A., STUHMER, W., GUTIERREZ, L. M. & CRIADO, M. (1995). alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur J Neurosci* **7**, 647-655.

GARCIA, A. G., GARCIA-DE-DIEGO, A. M., GANDIA, L., BORGES, R. & GARCIA-SANCHO, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* **86**, 1093-1131.

GENTRY, C. L. & LUKAS, R. J. (2002). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**, 359-385.

GERZANICH, V., WANG, F., KURYATOV, A. & LINDSTROM, J. (1998). alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca<sup>++</sup> permeability and Ca<sup>++</sup> modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 311-320.

GEULA, C. & MESULAM, M. M. (1996). Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* **6**, 165-177.

GINIATULLIN, R., NISTRI, A. & YAKEL, J. L. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci* **28**, 371-378.

GOEDERT, M. & JAKES, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* **9**, 4225-4230.

GONG, C. X., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (1994). Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* **61**, 765-772.

GONG, C. X., SHAIKH, S., WANG, J. Z., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **65**, 732-738.



GONG, C. X., SINGH, T. J., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **61**, 921-927.

GONZALEZ-RUBIO, J. M., ROJO, J., TAPIA, L., MANEU, V., MULET, J., VALOR, L. M., CRIADO, M., SALA, F., GARCIA, A. G. & GANDIA, L. (2006). Activation and blockade by choline of bovine  $\alpha 7$  and  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic receptors expressed in oocytes. *Eur J Pharmacol* **535**, 53-60.

GOTTI, C., MORETTI, M., GAIMARRI, A., ZANARDI, A., CLEMENTI, F. & ZOLI, M. (2007). Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* **74**, 1102-1111.

GRANDO, S. A. (1997). Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2**, 41-48.

GRIMES, C. A. & JOPE, R. S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3  $\beta$  and facilitated by lithium. *J Neurochem* **78**, 1219-1232.

GRONLIEN, J. H., HAKERUD, M., WEEN, H., THORIN-HAGENE, K., BRIGGS, C. A., GOPALAKRISHNAN, M. & MALYSZ, J. (2007). Distinct profiles of  $\alpha 7$  nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* **72**, 715-724.

GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., TUNG, Y. C., QUINLAN, M., WISNIEWSKI, H. M. & BINDER, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-4917.

GRUNDKE-IQBAL, I., VORBRODT, A. W., IQBAL, K., TUNG, Y. C., WANG, G. P. & WISNIEWSKI, H. M. (1988). Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* **464**, 43-52.

GU, H., WENGER, B. W., LOPEZ, I., MCKAY, S. B., BOYD, R. T. & MCKAY, D. B. (1996). Characterization and localization of adrenal nicotinic acetylcholine receptors: evidence that mA35-nicotinic receptors are the principal receptors mediating adrenal catecholamine secretion. *J Neurochem* **66**, 1454-1461.

HAJOS, M., HURST, R. S., HOFFMANN, W. E., KRAUSE, M., WALL, T. M., HIGDON, N. R. & GROPP, V. E. (2005). The selective  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 1213-1222.

HANGER, D. P., HUGHES, K., WOODGETT, J. R., BRION, J. P. & ANDERTON, B. H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**, 58-62.

HASEGAWA, M., WATANABE, A., TAKIO, K., SUZUKI, M., ARAI, T., TITANI, K. & IHARA, Y. (1993). Characterization of two distinct monoclonal antibodies to paired helical filaments: further evidence for fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem* **60**, 2068-2077.

HAYDAR, S. N. & DUNLOP, J. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors - Targets for the Development of Drugs to Treat Cognitive Impairment Associated with Schizophrenia and Alzheimer's Disease. *Curr Top Med Chem*.

HE, P. & SHEN, Y. (2009). Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **29**, 6545-6557.

HELLSTROM-LINDAHL, E., MOUSAVI, M., ZHANG, X., RAVID, R. & NORDBERG, A. (1999). Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Brain Res Mol Brain Res* **66**, 94-103.

HERNANDEZ-GUIJO, J. M., MANEU-FLORES, V. E., RUIZ-NUNO, A., VILLARROYA, M., GARCIA, A. G. & GANDIA, L. (2001). Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca<sup>2+</sup> channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci* **21**, 2553-2560.

HERRINGTON, J., PARK, Y. B., BABCOCK, D. F. & HILLE, B. (1996). Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca<sup>2+</sup> loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron* **16**, 219-228.

HOSHI, T., ROTHLEIN, J. & SMITH, S. J. (1984). Facilitation of Ca<sup>2+</sup>-channel currents in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5871-5875.

HU, M., GOPALAKRISHNAN, M. & LI, J. (2009). Positive allosteric modulation of alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lack of cytotoxicity in PC12 cells and rat primary cortical neurons. *Br J Pharmacol* **158**, 1857-1864.

HU, M., WARING, J. F., GOPALAKRISHNAN, M. & LI, J. (2008). Role of GSK-3beta activation and alpha7 nAChRs in Abeta(1-42)-induced tau phosphorylation in PC12 cells. *J Neurochem* **106**, 1371-1377.

HUGHES, K., NIKOLAKAKI, E., PLYTE, S. E., TOTTY, N. F. & WOODGETT, J. R. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo J* **12**, 803-808.

HURST, R. S., HAJOS, M., RAGGENBASS, M., WALL, T. M., HIGDON, N. R., LAWSON, J. A., RUTHERFORD-ROOT, K. L., BERKENPAS, M. B., HOFFMANN, W. E., PIOTROWSKI, D. W., GROPP, V. E., ALLAMAN, G., OGIER, R., BERTRAND, S., BERTRAND, D. & ARNERIC, S. P. (2005). A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci* **25**, 4396-4405.

INNOCENT, N., LIVINGSTONE, P. D., HONE, A., KIMURA, A., YOUNG, T., WHITEAKER, P., MCINTOSH, J. M. & WONNACOTT, S. (2008). Alpha-conotoxin Arenatus IB[V11L,V16D] [corrected] is a potent and selective antagonist at rat and human native alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **327**, 529-537.

IQBAL, K. & GRUNDKE-IQBAL, I. (2008). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* **12**, 38-55.

IRIZARRY, M. C., SORIANO, F., MCNAMARA, M., PAGE, K. J., SCHENK, D., GAMES, D. & HYMAN, B. T. (1997). Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* **17**, 7053-7059.

JONNALA, R. R. & BUCCAFUSCO, J. J. (2001). Relationship between the increased cell surface alpha7 nicotinic receptor expression and neuroprotection induced by several nicotinic receptor agonists. *J Neurosci Res* **66**, 565-572.

KADIR, A., ALMKVIST, O., WALL, A., LANGSTROM, B. & NORDBERG, A. (2006). PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **188**, 509-520.

KATZ, B. & THESLEFF, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* **138**, 63-80.

KE, L., EISENHOUR, C. M., BENCHERIF, M. & LUKAS, R. J. (1998). Effects of chronic nicotine treatment on expression of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. I. Dose- and time-dependent effects of nicotine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 825-840.

KIDOKORO, Y. & RITCHIE, A. K. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* **307**, 199-216.

KIHARA, T. & SHIMOHAMA, S. (2004). Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **64**, 99-105.

KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., HONDA, K., NAKAMIZO, T., SHIBASAKI, H., KUME, T. & AKAIKE, A. (2001).  $\alpha 7$  nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* **276**, 13541-13546.

KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., KIMURA, J., KUME, T., KOCHIYAMA, H., MAEDA, T. & AKAIKE, A. (1997). Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann Neurol* **42**, 159-163.

KIHARA, T., SHIMOHAMA, S., URUSHITANI, M., SAWADA, H., KIMURA, J., KUME, T., MAEDA, T. & AKAIKE, A. (1998). Stimulation of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res* **792**, 331-334.

KIM, S. H. & SUH, Y. H. (1996). Neurotoxicity of a carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neurochem* **67**, 1172-1182.

KOH, J. Y. & CHOI, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* **20**, 83-90.

KUKKONEN, J. P., SHARIATMADARI, R., COURTNEY, M. J. & AKERMAN, K. E. (1997). Localization of voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and neuropeptide Y immunoreactivity to varicosities in SH-SY5Y human neuroblastoma cells differentiated by treatment with the protein kinase inhibitor staurosporine. *Eur J Neurosci* **9**, 140-150.

KUMANO, K., NAKAO, A., NAKAJIMA, H., MIIKE, S., KURASAWA, K., SAITO, Y. & IWAMOTO, I. (2000). Blockade of JAK2 by tyrphostin AG-490 inhibits antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 209-214.

KUMAR-SINGH, S., THEUNS, J., VAN BROECK, B., PIRICI, D., VENNEKENS, K., CORSMIT, E., CRUTS, M., DERMAUT, B., WANG, R. & VAN BROECKHOVEN, C. (2006). Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A $\beta$ 42 and decreased A $\beta$ 40. *Hum Mutat* **27**, 686-695.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

LARA, B., GANDIA, L., MARTINEZ-SIERRA, R., TORRES, A. & GARCIA, A. G. (1998). Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch* **435**, 472-478.

LAU, K. F., MILLER, C. C., ANDERTON, B. H. & SHAW, P. C. (1999). Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3 $\beta$  promoter. *Genomics* **60**, 121-128.

LAUDENBACH, V., MEDJA, F., ZOLI, M., ROSSI, F. M., EVRARD, P., CHANGEUX, J. P. & GRESSENS, P. (2002). Selective activation of central subtypes of the nicotinic acetylcholine receptor has opposite effects on neonatal excitotoxic brain injuries. *Faseb J* **16**, 423-425.

LEDESMA, M. D., CORREAS, I., AVILA, J. & DIAZ-NIDO, J. (1992). Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* **308**, 218-224.

LEE, R. K., ARAKI, W. & WURTMAN, R. J. (1997). Stimulation of amyloid precursor protein synthesis by adrenergic receptors coupled to cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5422-5426.

LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. (1992). The disordered neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 653-656.

LEWIS, J., DICKSON, D. W., LIN, W. L., CHISHOLM, L., CORRAL, A., JONES, G., YEN, S. H., SAHARA, N., SKIPPER, L., YAGER, D., ECKMAN, C., HARDY, J., HUTTON, M. & MCGOWAN, E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487-1491.

LI, Y., PAPKE, R. L., HE, Y. J., MILLARD, W. J. & MEYER, E. M. (1999). Characterization of the neuroprotective and toxic effects of  $\alpha 7$  nicotinic receptor activation in PC12 cells. *Brain Res* **830**, 218-225.

LIU, Q. & ZHAO, B. (2004). Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br J Pharmacol* **141**, 746-754.

LIVETT, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* **64**, 1103-1161.

LOPEZ-HERNANDEZ, G. Y., THINSCHMIDT, J. S., MORAIN, P., TROCME-THIBIERGE, C., KEM, W. R., SOTI, F. & PAPKE, R. L. (2009). Positive modulation of  $\alpha 7$  nAChR responses in rat hippocampal interneurons to full agonists and the  $\alpha 7$ -selective partial agonists, 4OH-GTS-21 and S 24795. *Neuropharmacology* **56**, 821-830.

LOPEZ, M. G., MONTIEL, C., HERRERO, C. J., GARCIA-PALOMERO, E., MAYORGAS, I., HERNANDEZ-GUIJO, J. M., VILLARROYA, M., OLIVARES, R., GANDIA, L., MCINTOSH, J. M., OLIVERA, B. M. & GARCIA, A. G. (1998). Unmasking the functions of the chromaffin cell  $\alpha 7$  nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14184-14189.

LOPEZ, M. G., VILLARROYA, M., LARA, B., MARTINEZ SIERRA, R., ALBILLOS, A., GARCIA, A. G. & GANDIA, L. (1994). Q- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* **349**, 331-337.

LORRIO, S., SOBRADO, M., ARIAS, E., RODA, J. M., GARCIA, A. G. & LOPEZ, M. G. (2007). Galantamine postischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J Pharmacol Exp Ther* **322**, 591-599.

LOVESTONE, S., REYNOLDS, C. H., LATIMER, D., DAVIS, D. R., ANDERTON, B. H., GALLO, J. M., HANGER, D., MULOT, S., MARQUARDT, B., STABEL, S. & ET AL. (1994). Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* **4**, 1077-1086.

MACKRILL, J. J., CHALLISS, R. A., O'CONNELL D, A., LAI, F. A. & NAHORSKI, S. R. (1997). Differential expression and regulation of ryanodine receptor and myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels in mammalian tissues and cell lines. *Biochem J* **327** ( Pt 1), 251-258.

MACONOCHIE, D. J. & KNIGHT, D. E. (1992). Markov modelling of ensemble current relaxations: bovine adrenal nicotinic receptor currents analysed. *J Physiol* **454**, 155-182.

MAELICKE, A. (2000). Allosteric modulation of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **11 Suppl 1**, 11-18.

MARTIN-RUIZ, C. M., COURT, J. A., MOLNAR, E., LEE, M., GOTTI, C., MAMALAKI, A., TSOULOUFIS, T., TZARTOS, S., BALLARD, C., PERRY, R. H. & PERRY, E. K. (1999). Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **73**, 1635-1640.

MARTIN, E. D., GONZALEZ-GARCIA, C., MILAN, M., FARINAS, I. & CENA, V. (2004). Stressor-related impairment of synaptic transmission in hippocampal slices from alpha-synuclein knockout mice. *Eur J Neurosci* **20**, 3085-3091.

MARUBIO, L. M., GARDIER, A. M., DURIER, S., DAVID, D., KLINK, R., ARROYO-JIMENEZ, M. M., MCINTOSH, J. M., ROSSI, F., CHAMPTIAUX, N., ZOLI, M. & CHANGEUX, J. P. (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* **17**, 1329-1337.

MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. (1990). The role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and matrix Ca<sup>2+</sup> in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* **1018**, 287-291.

MEI, L., ROESKE, W. R. & YAMAMURA, H. I. (1989). The coupling of muscarinic receptors to hydrolysis of inositol lipids in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* **504**, 7-14.

MENDES, C. T., MURY, F. B., DE SA MOREIRA, E., ALBERTO, F. L., FORLENZA, O. V., DIAS-NETO, E. & GATTAZ, W. F. (2009). Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **259**, 16-22.

MONTERO, M., ALONSO, M. T., ALBILLOS, A., CUCHILLO-IBANEZ, I., OLIVARES, R., A, G. G., GARCIA-SANCHO, J. & ALVAREZ, J. (2001). Control of secretion by mitochondria depends on the size of the local [Ca<sup>2+</sup>] after chromaffin cell stimulation. *Eur J Neurosci* **13**, 2247-2254.

MONTERO, M., ALONSO, M. T., CARNICERO, E., CUCHILLO-IBANEZ, I., ALBILLOS, A., GARCIA, A. G., GARCIA-SANCHO, J. & ALVAREZ, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* **2**, 57-61.

MORISHIMA-KAWASHIMA, M., HASEGAWA, M., TAKIO, K., SUZUKI, M., YOSHIDA, H., WATANABE, A., TITANI, K. & IHARA, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* **16**, 365-371; discussion 371-380.

MORO, M. A., LOPEZ, M. G., GANDIA, L., MICHELENA, P. & GARCIA, A. G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem* **185**, 243-248.

MORTON, A. J., HAMMOND, C., MASON, W. T. & HENDERSON, G. (1992). Characterisation of the L- and N-type calcium channels in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells: calcium imaging and single channel recording. *Brain Res Mol Brain Res* **13**, 53-61.

MOUSAVI, M., HELLSTROM-LINDAHL, E., GUAN, Z. Z., SHAN, K. R., RAVID, R. & NORDBERG, A. (2003). Protein and mRNA levels of nicotinic receptors in brain of tobacco using controls and patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience* **122**, 515-520.

MUKHIN, A. G., GUNDISCH, D., HORTI, A. G., KOREN, A. O., TAMAGNAN, G., KIMES, A. S., CHAMBERS, J., VAUPEL, D. B., KING, S. L., PICCIOTTO, M. R., INNIS, R. B. & LONDON, E. D. (2000). 5-Iodo-A-85380, an  $\alpha 4\beta 2$  subtype-selective ligand for nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **57**, 642-649.

NAGELE, R. G., D'ANDREA, M. R., ANDERSON, W. J. & WANG, H. Y. (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **110**, 199-211.

NAKAYAMA, H., NUMAKAWA, T., IKEUCHI, T. & HATANAKA, H. (2001). Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *J Neurochem* **79**, 489-498.

NGUYEN, H. N., RASMUSSEN, B. A. & PERRY, D. C. (2003). Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 1090-1097.

NOBLE, M. D., BROWN, T. H. & PEACOCK, J. H. (1978). Regulation of acetylcholine receptor levels by a cholinergic agonist in mouse muscle cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3488-3492.

NORDBERG, A. & WINBLAD, B. (1986). Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci Lett* **72**, 115-119.

O'NEILL, M. J., MURRAY, T. K., LAKICS, V., VISANJI, N. P. & DUTY, S. (2002). The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**, 399-411.

ODDO, S., VASILEVKO, V., CACCAMO, A., KITAZAWA, M., CRIBBS, D. H. & LAFERLA, F. M. (2006). Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* **281**, 39413-39423.

OGDEN, D. C. & COLQUHOUN, D. (1985). Ion channel block by acetylcholine, carbachol and suberyldicholine at the frog neuromuscular junction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **225**, 329-355.

OLALE, F., GERZANICH, V., KURYATOV, A., WANG, F. & LINDSTROM, J. (1997). Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha3, alpha4, and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 675-683.

PAPKE, R. L., SANBERG, P. R. & SHYTLE, R. D. (2001). Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 646-656.

PARK, Y. B., HERRINGTON, J., BABCOCK, D. F. & HILLE, B. (1996). Ca<sup>2+</sup> clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **492** ( Pt 2), 329-346.

PENG, X., KATZ, M., GERZANICH, V., ANAND, R. & LINDSTROM, J. (1994). Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* **45**, 546-554.

PEREZ, M., HERNANDEZ, F., GOMEZ-RAMOS, A., SMITH, M., PERRY, G. & AVILA, J. (2002). Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur J Biochem* **269**, 1484-1489.

PERRY, E. K., TOMLINSON, B. E., BLESSED, G., PERRY, R. H., CROSS, A. J. & CROW, T. T. (1981). Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *Lancet* **2**, 149.

PICCIOTTO, M. R., ZOLI, M., RIMONDINI, R., LENA, C., MARUBIO, L. M., PICH, E. M., FUXE, K. & CHANGEUX, J. P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* **391**, 173-177.

PIZZI, M., VALERIO, A., ARRIGHI, V., GALLI, P., BELLONI, M., RIBOLA, M., ALBERICI, A., SPANO, P. & MEMO, M. (1995). Inhibition of glutamate-induced neurotoxicity by a tau antisense oligonucleotide in primary culture of rat cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* **7**, 1603-1613.

PRENDERGAST, M. A., HARRIS, B. R., MAYER, S., HOLLEY, R. C., HAUSER, K. F. & LITTLETON, J. M. (2001). Chronic nicotine exposure reduces N-methyl-D-aspartate receptor-mediated damage in the hippocampus without altering calcium accumulation or extrusion: evidence of calbindin-D28K overexpression. *Neuroscience* **102**, 75-85.

PRICE, J. L., DAVIS, P. B., MORRIS, J. C. & WHITE, D. L. (1991). The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **12**, 295-312.

QI, X. L., NORDBERG, A., XIU, J. & GUAN, Z. Z. (2007). The consequences of reducing expression of the alpha7 nicotinic receptor by RNA interference and of stimulating its activity with an alpha7 agonist in SH-SY5Y cells indicate that this receptor plays a neuroprotective role in connection with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **51**, 377-383.

QIAN, W., SHI, J., YIN, X., IQBAL, K., GRUNDKE-IQBAL, I., GONG, C. X. & LIU, F. (2009). PP2A Regulates Tau Phosphorylation Directly and also Indirectly via Activating GSK-3beta. *J Alzheimers Dis*.

QUESADA, A., LEE, B. Y. & MICEVYCH, P. E. (2008). PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* **68**, 632-644.

RAINA, P., SANTAGUIDA, P., ISMAILA, A., PATTERSON, C., COWAN, D., LEVINE, M., BOOKER, L. & OREMUS, M. (2008). Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med* **148**, 379-397.

RAPOPORT, S. I. (2002). Hydrogen magnetic resonance spectroscopy in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **1**, 82.

REEVE, H. L., VAUGHAN, P. F. & PEERS, C. (1994). Calcium channel currents in undifferentiated human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells: actions and possible interactions of dihydropyridines and omega-conotoxin. *Eur J Neurosci* **6**, 943-952.

REN, K., PUIG, V., PAPKE, R. L., ITOH, Y., HUGHES, J. A. & MEYER, E. M. (2005). Multiple calcium channels and kinases mediate alpha7 nicotinic receptor neuroprotection in PC12 cells. *J Neurochem* **94**, 926-933.

RIDLEY, D. L., PAKKANEN, J. & WONNACOTT, S. (2002). Effects of chronic drug treatments on increases in intracellular calcium mediated by nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *Br J Pharmacol* **135**, 1051-1059.

RITCHIE, C. W., AMES, D., CLAYTON, T. & LAI, R. (2004). Metaanalysis of randomized trials of the efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* **12**, 358-369.

RIZZUTO, R., BRINI, M., BASTIANUTTO, C., MARSAULT, R. & POZZAN, T. (1995). Photoprotein-mediated measurement of calcium ion concentration in mitochondria of living cells. *Methods Enzymol* **260**, 417-428.

RIZZUTO, R., SIMPSON, A. W., BRINI, M. & POZZAN, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* **358**, 325-327.

ROBB-GASPERS, L. D., BURNETT, P., RUTTER, G. A., DENTON, R. M., RIZZUTO, R. & THOMAS, A. P. (1998). Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *Embo J* **17**, 4987-5000.

ROBERSON, E. D., SCEARCE-LEVIE, K., PALOP, J. J., YAN, F., CHENG, I. H., WU, T., GERSTEIN, H., YU, G. Q. & MUCKE, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750-754.

ROBERTS, D. J., KHAN, N., McDONALD, R. L., WEBSTER, N. J., PEERS, C. & VAUGHAN, P. F. (2001). Inhibition of depolarisation-evoked [(3)H]noradrenaline release from SH-SY5Y human neuroblastoma cells by muscarinic (M1) receptors is not mediated by changes in [Ca(2+)]. *Brain Res Mol Brain Res* **87**, 81-91.

ROSA, J. M., GANDIA, L. & GARCIA, A. G. (2009). Inhibition of N and PQ calcium channels by calcium entry through L channels in chromaffin cells. *Pflugers Arch* **458**, 795-807.

SANTODOMINGO, J., VAY, L., CAMACHO, M., HERNANDEZ-SANMIGUEL, E., FONTERIZ, R. I., LOBATON, C. D., MONTERO, M., MORENO, A. & ALVAREZ, J. (2008). Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules. *Eur J Neurosci* **28**, 1265-1274.



SCHRATTENHOLZ, A., PEREIRA, E. F., ROTH, U., WEBER, K. H., ALBUQUERQUE, E. X. & MAELICKE, A. (1996). Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol Pharmacol* **49**, 1-6.

SEDDIK, R., BRADAIA, A. & TROUSLARD, J. (2003). Choline induces Ca<sup>2+</sup> entry in cultured sympathetic neurones isolated from rat superior cervical ganglion. *Eur J Pharmacol* **471**, 165-176.

SHAW, S., BENCHERIF, M. & MARRERO, M. B. (2002). Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid. *J Biol Chem* **277**, 44920-44924.

SHEA, T. B. (1997). Phospholipids alter tau conformation, phosphorylation, proteolysis, and association with microtubules: implication for tau function under normal and degenerative conditions. *J Neurosci Res* **50**, 114-122.

SHIMOHAMA, S., GREENWALD, D. L., SHAFRON, D. H., AKAICA, A., MAEDA, T., KANEKO, S., KIMURA, J., SIMPKINS, C. E., DAY, A. L. & MEYER, E. M. (1998). Nicotinic alpha 7 receptors protect against glutamate neurotoxicity and neuronal ischemic damage. *Brain Res* **779**, 359-363.

SKOK, M., GRAILHE, R. & CHANGEUX, J. P. (2005). Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response. *Eur J Pharmacol* **517**, 246-251.

SKOK, M. V., KALASHNIK, E. N., KOVAL, L. N., TSETLIN, V. I., UTKIN, Y. N., CHANGEUX, J. P. & GRAILHE, R. (2003). Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol* **64**, 885-889.

SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., CRAIN, B. J., BELL, J. M., BISSETTE, G. & NEMEROFF, C. B. (1990). Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2452-2455.

SPIITAEELS, K., VAN DEN HAUTE, C., VAN DORPE, J., GEERTS, H., MERCKEN, M., BRUYNSEELS, K., LASRADO, R., VANDEZANDE, K., LAENEN, I., BOON, T., VAN LINT, J., VANDENHEEDE, J., MOECHARS, D., LOOS, R. & VAN LEUVEN, F. (2000). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* **275**, 41340-41349.

SRIVASTAVA, A. K. & PANDEY, S. K. (1998). Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem* **182**, 135-141.

STAMBOLIC, V. & WOODGETT, J. R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* **303** ( Pt 3), 701-704.

STAUDERMAN, K. A., MAHAFFY, L. S., AKONG, M., VELICELEBI, G., CHAVEZ-NORIEGA, L. E., CRONA, J. H., JOHNSON, E. C., ELLIOTT, K. J., GILLESPIE, A., REID, R. T., ADAMS, P., HARPOLD, M. M. & COREY-NAEVE, J. (1998). Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations alpha2beta4, alpha3beta4 and alpha4beta4 stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 777-789.

STEVENS, T. R., KRUEGER, S. R., FITZSIMONDS, R. M. & PICCIOTTO, M. R. (2003). Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L-type calcium channel inactivation. *J Neurosci* **23**, 10093-10099.

TACHIKAWA, E., MIZUMA, K., KUDO, K., KASHIMOTO, T., YAMATO, S. & OHTA, S. (2001). Characterization of the functional subunit combination of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* **312**, 161-164.

TANAKA, T., ZHONG, J., IQBAL, K., TRENNER, E. & GRUNDKE-IQBAL, I. (1998). The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases. *FEBS Lett* **426**, 248-254.

TERZANO, S., COURT, J. A., FORNASARI, D., GRIFFITHS, M., SPURDEN, D. P., LLOYD, S., PERRY, R. H., PERRY, E. K. & CLEMENTI, F. (1998). Expression of the alpha3 nicotinic receptor subunit mRNA in aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **63**, 72-78.

TIAN, D., ZHU, M., LI, J., MA, Y. & WU, R. (2009). Cigarette smoke extract induces activation of beta-catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line. *Toxicol Lett* **187**, 58-62.

TIAN, Q., LIN, Z. Q., WANG, X. C., CHEN, J., WANG, Q., GONG, C. X. & WANG, J. Z. (2004). Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience* **126**, 277-284.

TIZABI, Y., MANAYE, K. F., SMOOT, D. T. & TAYLOR, R. E. (2004). Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox Res* **6**, 311-316.

TRETTER, L., CHINOPOULOS, C. & ADAM-VIZI, V. (1998). Plasma membrane depolarization and disturbed Na<sup>+</sup> homeostasis induced by the protonophore carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon in isolated nerve terminals. *Mol Pharmacol* **53**, 734-741.

UBERTI, D., RIZZINI, C., SPANO, P. F. & MEMO, M. (1997). Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurosci Lett* **235**, 149-153.

UCEDA, G., GARCIA, A. G., GUANTES, J. M., MICHELENA, P. & MONTIEL, C. (1995). Effects of Ca<sup>2+</sup> channel antagonist subtypes on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. *Eur J Pharmacol* **289**, 73-80.

UEDA, M., IIDA, Y., KITAMURA, Y., KAWASHIMA, H., OGAWA, M., MAGATA, Y. & SAJI, H. (2008). 5-Iodo-A-85380, a specific ligand for alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors, prevents glutamate neurotoxicity in rat cortical cultured neurons. *Brain Res* **1199**, 46-52.

ULRICH, J., JOHANNSON-LOCHER, G., SEILER, W. O. & STAHELIN, H. B. (1997). Does smoking protect from Alzheimer's disease? Alzheimer-type changes in 301 unselected brains from patients with known smoking history. *Acta Neuropathol* **94**, 450-454.

ULLOA, L. (2005). The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 673-684.

UNSICKER, K., GRIESSER, G. H., LINDMAR, R., LOFFELHOLZ, K. & WOLF, U. (1980). Establishment, characterization and fibre outgrowth of isolated bovine adrenal medullary cells in long-term cultures. *Neuroscience* **5**, 1445-1460.

VAN ACKER, K., BAUTMANS, B., BULTYNCK, G., MAES, K., WEIDEMA, A. F., DE SMET, P., PARYS, J. B., DE SMEDT, H., MISSIAEN, L. & CALLEWAERT, G. (2000). Mapping of IP(3)-mediated Ca(2+) signals in single human neuroblastoma SH-SY5Y cells: cell volume shaping the Ca(2+) signal. *J Neurophysiol* **83**, 1052-1057.

VAUGHAN, P. F., KAYE, D. F., McDONALD, R., REEVE, H. L., BALL, S. G. & PEERS, C. (1993a). Bradykinin-evoked release of [3H]noradrenaline from the human neuroblastoma SH-SY5Y. *Biochem Soc Trans* **21**, 420S.

VAUGHAN, P. F., KAYE, D. F., REEVE, H. L., BALL, S. G. & PEERS, C. (1993b). Nicotinic receptor-mediated release of noradrenaline in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem* **60**, 2159-2166.

VILLARROYA, M., OLIVARES, R., RUIZ, A., CANO-ABAD, M. F., DE PASCUAL, R., LOMAX, R. B., LOPEZ, M. G., MAYORGAS, I., GANDIA, L. & GARCIA, A. G. (1999). Voltage inactivation of Ca<sup>2+</sup> entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca<sup>2+</sup> channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* **516** ( Pt 2), 421-432.

WANG, D., CHIARA, D. C., XIE, Y. & COHEN, J. B. (2000a). Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with 4-benzoylbenzoylcholine, a novel photoaffinity competitive antagonist. *J Biol Chem* **275**, 28666-28674.

WANG, H. Y., LEE, D. H., DAVIS, C. B. & SHANK, R. P. (2000b). Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* **75**, 1155-1161.

WANG, J. Z., GONG, C. X., ZAIDI, T., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (1995). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem* **270**, 4854-4860.

WANG, Q. M., FIOL, C. J., DEPAOLI-ROACH, A. A. & ROACH, P. J. (1994). Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **269**, 14566-14574.

WECKER, L. (1990). Dietary choline: a limiting factor for the synthesis of acetylcholine by the brain. *Adv Neurol* **51**, 139-145.

WEVERS, A. & SCHRODER, H. (1999). Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **1**, 207-219.

WHITEHOUSE, P. J., PRICE, D. L., STRUBLE, R. G., CLARK, A. W., COYLE, J. T. & DELON, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**, 1237-1239.

WILSON, S. P. & KIRSHNER, N. (1977). The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J Neurochem* **28**, 687-695.

WISHKA, D. G., WALKER, D. P., YATES, K. M., REITZ, S. C., JIA, S., MYERS, J. K., OLSON, K. L., JACOBSEN, E. J., WOLFE, M. L., GROPP, V. E., HANCHAR, A. J., THORNBURGH, B. A., CORTES-BURGOS, L. A., WONG, E. H., STATON, B. A., RAUB, T. J., HIGDON, N. R., WALL, T. M., HURST, R. S., WALTERS, R. R., HOFFMANN, W. E., HAJOS, M., FRANKLIN, S., CAREY, G., GOLD, L. H., COOK, K. K., SANDS, S. B., ZHAO, S. X., SOGLIA, J. R., KALGUTKAR, A. S., ARNERIC, S. P. & ROGERS, B. N. (2006). Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine

receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure--activity relationship. *J Med Chem* **49**, 4425-4436.

XU, T., NARAGHI, M., KANG, H. & NEHER, E. (1997). Kinetic studies of Ca<sup>2+</sup> binding and Ca<sup>2+</sup> clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J* **73**, 532-545.

ZAMANI, M. R., ALLEN, Y. S., OWEN, G. P. & GRAY, J. A. (1997). Nicotine modulates the neurotoxic effect of beta-amyloid protein(25-35) in hippocampal cultures. *Neuroreport* **8**, 513-517.

ZHENG, W. H., BASTIANETTO, S., MENNICKEN, F., MA, W. & KAR, S. (2002). Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* **115**, 201-211.